

T.D.
M/202

Antonio Jesús Marín Caballos

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA SEÑAL DE CALCIO Y LAS CORRIENTES
IÓNICAS EN EL ACOPLAMIENTO ENTRE EL ESTÍMULO Y LA
SECRECIÓN EN CÉLULAS PINEALES EN LA RATA**

Sevilla, 1995



R. 23400



**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA MEDICA Y
BIOFISICA**
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Avda. Sánchez Pizjuán, 4 E-41009 SEVILLA ESPAÑA

Telfs.: (34 5) 455 1768, fax: (34 5) 455 1769
490 0066

Dña. LUCÍA TABARES DOMÍNGUEZ, Profesor Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que Don Antonio Marín Caballos, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado, bajo su dirección en el Departamento de Fisiología: Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla, la Tesis que lleva el título: ESTUDIO DE LA SEÑAL DE CALCIO Y LAS CORRIENTES IÓNICAS EN EL ACOPLAMIENTO ENTRE EL ESTÍMULO Y LA SECRECIÓN EN CÉLULAS PINEALES EN LA RATA, para optar al título de Doctor.

Para que conste donde proceda se expide el presente certificado en Sevilla a veintitres de junio de mil novecientos noventa y cinco.

Lucía Tabares



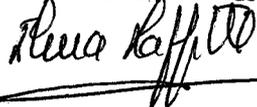
Fdo.: Lucía Tabares Domínguez

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 56 número 6 del libro
correspondiente.

Sevilla, 26 JUN 1995

El Jefe del Negociado de Tesis,



Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en DPTO. FISILOGIA MEDICA y BIOFISICA
de la FACULTAD DE MEDICINA
de esta Universidad desde el día 26 JUNIO 1995
hasta el día 12 JULIO 1995

Sevilla 26 de JUNIO

de 1995

EL DIRECTOR DE

**ESTUDIO DE LA SEÑAL DE CALCIO Y LAS CORRIENTES
IÓNICAS EN EL ACOPLAMIENTO ENTRE EL ESTÍMULO Y LA
SECRECIÓN EN CÉLULAS PINEALES EN LA RATA**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la
Universidad de Sevilla, por:

Antonio Jesús Marín Caballos



DIRECTORA:

Dra. Lucía Tabares Domínguez

Sevilla, 1995

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1.1. LA PINEAL O EPÍFISIS..... | 1 |
| 1.1.1. Evolución filogenética de la pineal..... | 2 |
| 1.1.2. Similitudes entre la pineal y la retina..... | 4 |
| 1.2. ANATOMÍA DE LA PINEAL..... | 8 |
| 1.2.1. Inervación..... | 8 |
| 1.2.1.1. <i>Inervación periférica simpática</i> | 10 |
| 1.2.1.2. <i>Inervación central</i> | 12 |
| 1.2.1.3. <i>Otras conexiones nerviosas</i> | 12 |
| 1.3. LA PINEAL COMO GLÁNDULA ENDOCRINA..... | 14 |
| 1.3.1. El pinealocito tiene una ultraestructura neurosecretora..... | 14 |
| 1.3.2. Síntesis de indolaminas pineales..... | 16 |
| 1.3.2.1. <i>Productos indólicos de secreción</i> | 18 |
| 1.3.3. Hormonas peptídicas..... | 19 |
| 1.3.4. Regulación de la secreción de melatonina por NA y relación con el fotoperíodo..... | 20 |
| 1.3.4.1. <i>La estimulación β-adrenérgica</i> | 20 |
| 1.3.4.2. <i>La estimulación α_1-adrenérgica y la potenciación de la síntesis de nucleótidos cíclicos</i> | 22 |
| 1.3.4.3. <i>El papel de los nucleótidos cíclicos</i> | 24 |
| 1.3.4.4. <i>Regulación circadiana de la expresión génica de NAT</i> | 25 |
| 1.3.5. Regulación de la síntesis de melatonina por otros receptores de membrana..... | 27 |
| 1.3.6. Fenómenos eléctricos de membrana..... | 28 |
| 1.3.7. Acciones de la melatonina..... | 30 |
| 1.3.7.1 <i>Inhibición de la síntesis de AMPc mediada por receptores de melatonina</i> | 32 |
| 1.3.8. Localización del receptor de melatonina..... | 32 |
| 1.4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO..... | 34 |

2. MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 2.1. CULTIVO CELULAR..... | 37 |
| 2.1.1. Extracción de la glándula pineal de rata..... | 37 |
| 2.1.1.1. <i>Localización anatómica</i> | 37 |
| 2.1.1.2. <i>Proceder en la extracción de la glándula pineal</i> | 39 |
| 2.1.2. Dispersión celular..... | 40 |
| 2.1.3. Siembra y mantenimiento del cultivo celular..... | 40 |
| 2.1.3.1. <i>Preparación de soportes y material para cultivo celular</i> | 41 |
| 2.2 SOLUCIONES..... | 42 |
| 2.2.1. Soluciones empleadas en la preparación celular..... | 42 |
| 2.2.2. Soluciones de registro..... | 44 |
| 2.2.2.1. <i>Ajuste de la $[Ca^{2+}]$ en las soluciones</i> | 44 |
| 2.3. MICROFLUOROMETRÍA..... | 45 |
| 2.3.1. Indicador de calcio..... | 45 |
| 2.3.2. Equipo de microfluorimetría..... | 47 |
| 2.3.3. Filtros y otros componentes ópticos..... | 49 |
| 2.3.4. El controlador..... | 53 |
| 2.3.5. Sensibilidad de la medida a distintas longitudes de onda de excitación..... | 54 |
| 2.3.6. Procedimientos de calibración..... | 56 |
| 2.3.7. Proceder experimental..... | 57 |
| 2.3.7.1. <i>Preparación del fura-2 AM</i> | 57 |
| 2.3.7.2. <i>Incubación y registro</i> | 58 |
| 2.3.8. Adquisición y análisis..... | 58 |
| 2.4. Registro de corrientes iónicas..... | 60 |
| 2.4.1. Equipo de "patch-clamp"..... | 60 |
| 2.4.2. Microelectrodos de registro..... | 62 |
| 2.4.3. Registro de corrientes a través de canales iónicos individuales..... | 62 |
| 2.4.4. Registros de corrientes iónicas en célula completa..... | 65 |
| 2.4.5. Aplicación de drogas..... | 65 |
| 2.4.6. Adquisición y análisis..... | 67 |
| 2.5. REGISTROS POTENCIAL DE MEMBRANA..... | 68 |
| 2.5.1. Perforación con nistatina..... | 68 |
| 2.5.2. Registro del potencial de membrana en fijación de corriente..... | 69 |

| | |
|---|----|
| 2.6. REGISTRO DE LA CAPACIDAD ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA..... | 70 |
| 2.6.1. Detección de fase..... | 70 |
| 2.6.1.1. <i>Simulación de la medida de la capacidad eléctrica con el método de la detección de fase</i> | 71 |
| 2.6.1.2. <i>Ajuste de fase</i> | 73 |
| 2.6.2. Adquisición y registro..... | 73 |
| 2.6.2.1. <i>Calibración de la capacidad y ajuste de fase automático ("Phase Tracking")</i> | 74 |
| 2.6.2.2. <i>Pipetas de registro</i> | 74 |
| 2.7. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE INDOLAMINAS..... | 76 |
| 2.7.1. Fabricación de electrodos..... | 76 |
| 2.7.2. Adquisición y registro..... | 79 |

3. RESULTADOS, CALCIO CITOSÓLICO

| | |
|--|-----|
| 3.1. LA SEÑAL DE Ca^{2+} INDUCIDA POR NA..... | 81 |
| 3.1.1. NA induce incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un curso temporal bimodal..... | 81 |
| 3.1.2. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está mediado por receptores adrenérgicos α_1 | 83 |
| 3.1.3. Curva dosis-respuesta ($[\text{PE}]-[\text{Ca}^{2+}]_i$)..... | 85 |
| 3.1.4. Liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares..... | 88 |
| 3.1.4.1. <i>Cinética de liberación de Ca^{2+}</i> | 88 |
| 3.1.4.2. <i>Liberaciones múltiples</i> | 91 |
| 3.1.4.3. <i>Duración de la liberación</i> | 94 |
| 3.1.5. Duración de la entrada de Ca^{2+} | 97 |
| 3.2. LA SEÑAL DE Ca^{2+} INDUCIDA POR ACh..... | 97 |
| 3.2.1. ACh induce incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un curso temporal unimodal..... | 97 |
| 3.2.2. Liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular..... | 99 |
| 3.2.3. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está mediado por receptores muscarínicos..... | 99 |
| 3.2.4. Relación $[\text{ACh}]-[\text{Ca}^{2+}]_i$ | 101 |
| 3.2.5. Cinética de la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares..... | 101 |
| 3.3. LIBERACIÓN SELECTIVA DE Ca^{2+} DE ALMACENES INTRACELULARES..... | 103 |
| 3.3.1. Relleno de los almacenes de Ca^{2+} y recuperación de la liberación de Ca^{2+} .. | 103 |
| 3.3.2. Vaciamiento no recíproco de los reservorios intracelulares..... | 105 |
| 3.4. CURSO TEMPORAL DEL DECREMENTO DE LAS SEÑALES DE Ca^{2+} | 109 |
| 3.4.1. Estimulaciones sucesivas con PE originan señales de Ca^{2+} progresivamente menores..... | 109 |
| 3.4.2. Estimulaciones sucesivas de ACh disminuyen la amplitud de la señal de Ca^{2+} | 112 |
| 3.4.3. ¿Desensibilización homóloga o vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares?..... | 114 |
| 3.4.4. ¿Desensibilización heteróloga?..... | 116 |
| 3.4.5. Contenido de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares..... | 116 |
| 3.4.6. Estimulaciones supramáximas muscarínicas no vacían el reservorio de Ca^{2+} asociado a estimulación adrenérgica..... | 118 |
| 3.5. ¿DOS RESERVORIOS INTRACELULARES DISTINTOS?..... | 120 |
| 3.5.1. Las señales de Ca^{2+} son insensibles a PTX..... | 120 |
| 3.5.2. La liberación de Ca^{2+} intracelular no es sensible a cafeína..... | 120 |
| 3.5.3. No efecto de tapsigargina..... | 122 |

| | |
|--|-----|
| 3.6. BLOQUEO DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} | 122 |
| 3.7. OSCILACIONES ESPONTANEAS DEL Ca^{2+} CITOSÓLICO..... | 127 |

4. RESULTADOS, CORRIENTES IÓNICAS Y POTENCIAL DE MEMBRANA

| | |
|---|-----|
| 4.1. CORRIENTES IÓNICAS | 129 |
| 4.1.1. Canales activados por voltaje..... | 129 |
| 4.1.1.1. <i>Canales de Ca^{2+} activados por voltaje</i> | 129 |
| 4.1.1.2. <i>Corrientes de potasio activadas por voltaje</i> | 133 |
| 4.1.2. Corrientes activadas por agonistas externos (NA y ACh)..... | 136 |
| 4.1.2.1. <i>NA y ACh inducen la activación de una conductancia de K^+</i> | 136 |
| 4.1.2.1.1. <i>La corriente de K^+ activada por agonista es dependiente de Ca^{2+}</i> | 136 |
| 4.1.2.2. <i>NA y ACh también activan una conductancia de Cl</i> | 138 |
| 4.1.2.2.1. <i>La activación de la conductancia registrada a potenciales negativos depende de la $[Ca^{2+}]_i$</i> | 139 |
| 4.1.2.3. <i>Activación simultánea de I_K y I_{Cl}</i> | 141 |
| 4.1.2.3.1. <i>Curvas corriente-voltaje de $I_{K(Ca)}$ y $I_{Cl(Ca)}$</i> | 143 |
| 4.1.2.3.2. <i>La activación de $I_{Cl(Ca)}$ y $I_{K(Ca)}$ por NA es mediada a través de receptores α_1-adrenérgicos</i> | 147 |
| 4.1.2.4. <i>Estudio de las $I_{Cl(Ca)}$ e $I_{K(Ca)}$ inducidas con soluciones de Ca^{2+}</i> | 147 |
| 4.2. POTENCIAL DE MEMBRANA | 149 |
| 4.2.1. Registro en fijación de corriente..... | 151 |
| 4.2.1.1. <i>El potencial de reversión</i> | 153 |
| 4.2.2. Modificaciones de amplitud de una corriente unitaria <i>in situ</i> | 153 |
| 4.2.3. Despolarizaciones transitorias espontáneas en espiga..... | 158 |

5. RESULTADOS, SECRECIÓN

| | |
|--|-----|
| 5.1. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE INDOLAMINAS..... | 164 |
| 5.1.1 Registros voltamétricos en poblaciones celulares..... | 164 |
| 5.1.2. Registros amperométricos en célula única..... | 166 |
| 5.2. REGISTRO DE CAPACIDAD ELÉCTRICA..... | 168 |
| 5.2.1. Cambios de la capacidad eléctrica de la membrana celular..... | 168 |

6. DISCUSIÓN

| | |
|--|-----|
| 6.1. LA SEÑAL DE Ca^{2+} | 174 |
| 6.1.1. El patrón de la señal de calcio inducida por NA..... | 177 |
| 6.1.2. El patrón de la señal de calcio inducida por ACh..... | 177 |
| 6.1.3. El significado funcional de la señal de Ca^{2+} inducida por NA..... | 179 |
| 6.1.4. El significado funcional de la señal de Ca^{2+} inducida por ACh..... | 179 |
| 6.1.5. Segundos mensajeros intracelulares..... | 179 |
| 6.1.6. Liberación de calcio inducida por calcio (CICR)..... | 180 |
| 6.1.7. El decremento de la señal de Ca^{2+} | 180 |
| 6.1.8. Dos almacenes funcionalmente distintos..... | 181 |
| 6.1.9. Modelos de liberación selectiva de Ca^{2+} de almacenes intracelulares..... | 182 |
| 6.1.9.1. Liberación cuántica de Ca^{2+} de almacenes intracelulares..... | 182 |
| 6.1.9.2. Coexistencia de distintos canales de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares..... | 183 |
| 6.1.9.3. Colocalización espacial de receptores de membrana y reservorios de Ca^{2+} intracelulares | 184 |
| 6.2. BASES IÓNICAS DE LOS CAMBIOS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA INDUCIDOS POR AGONISTA..... | 186 |
| 6.2.1. Fenómenos eléctricos de membrana..... | 186 |
| 6.2.2. Corrientes activadas por voltaje | 187 |
| 6.2.3. Corrientes iónicas activadas por Ca^{2+} | 187 |
| 6.2.3.1. Transitoriedad de las corrientes iónicas activadas por Ca^{2+} | 188 |
| 6.2.3.2. Corrientes activadas por un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} | 189 |
| 6.2.4. Papel funcional de la activación de $g_{Cl(Ca)}$ y $g_{K(Ca)}$ | 190 |
| 6.2.5. Modificaciones del potencial de membrana inducidas por $I_{Cl(Ca)}$ e $I_{K(Ca)}$ | 191 |
| 6.3. SECRECIÓN DE INDOLAMINAS..... | 193 |
| 6.3.1. Productos de secreción en poblaciones celulares..... | 194 |
| 6.3.2. Productos de secreción en célula única..... | 194 |
| 6.3.3. Medidas de capacidad eléctrica..... | 195 |
| CONCLUSIONES..... | 197 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 201 |

INTRODUCCIÓN

1.1. LA PINEAL O EPÍFISIS

La pineal es una evaginación dorsal del diencéfalo, que junto a las comisuras habenuar y posterior constituye el epitálamo. Esta estructura se comporta como un órgano fotorreceptor en peces, anfibios y reptiles, como un reloj biológico en aves, y como una glándula endocrina en mamíferos.

En los mamíferos regula la actividad endocrina del resto de las glándulas endocrinas: adenohipófisis, neurohipófisis, páncreas endocrino, paratiroides, corteza y médula suprarrenales y gónadas (Relkin, 1983). En general, los efectos de la secreción pineal son inhibidores. Por ejemplo, las hormonas secretadas por los pinealocitos reducen la síntesis y liberación de diversas hormonas de la adenohipófisis, tanto por acción directa sobre las células secretoras de la glándula como, indirectamente, inhibiendo la producción de factores de liberación en el hipotálamo.

Introducción

1.1.1 Evolución filogenética de la pineal

En los vertebrados la pineal deriva embriológicamente de una evaginación dorsal del techo del tercer ventrículo, situada entre la comisura habenular y la posterior. En vertebrados inferiores emergen dos divertículos, para formar la pineal propiamente y el órgano parapineal, mientras en aves y mamíferos sólo uno, que da lugar a la pineal.

En peces, anfibios y reptiles, la pineal contiene neuronas sensoriales con fotopigmentos y segmentos externos lamelados (Figura 1), y desarrolla respuestas electrofisiológicas a la estimulación lumínica como verdaderos fotorreceptores. Adicionalmente en estas especies, la pineal regula la pigmentación cutánea, ya que los fotorreceptores además de hacer sinapsis con otras neuronas producen melatonina, producto de secreción que tiene un efecto hipopigmentario sobre los melanocitos de la piel.

La pineal de las aves contiene células que aunque, no muestran la respuesta electrofisiológica propia de los fotorreceptores y carecen de contacto sináptico con células nerviosas, conservan alguna de sus características (Tabla I) y responden a la luz. Por ejemplo, las células de la pineal de pollo disociadas en cultivo secretan melatonina con un ritmo circadiano que puede ser alterado mediante estimulación lumínica (Robertson y Taakahashi, 1988; Zatz, Mullen, Moscal, 1988) (ver Figura 2 A).

La pineal de mamíferos adultos no muestra ninguna evidencia de ser fotosensible, aunque en las ratas recién nacidas, por ejemplo, los pinealocitos tienen una estructura transitoria al microscopio electrónico semejante a la de los fotorreceptores. No obstante, en el adulto conservan la capacidad de transducción fotoendocrina gracias a que le llega desde la retina información nerviosa sobre la luminosidad ambiental a través de inervación periférica simpática (Figura 2 B).

Al avanzar en la escala filogenética, con la disminución de la fotosensibilidad de los pinealocitos se incrementa la actividad secretora, ya que los fotorreceptores pineales

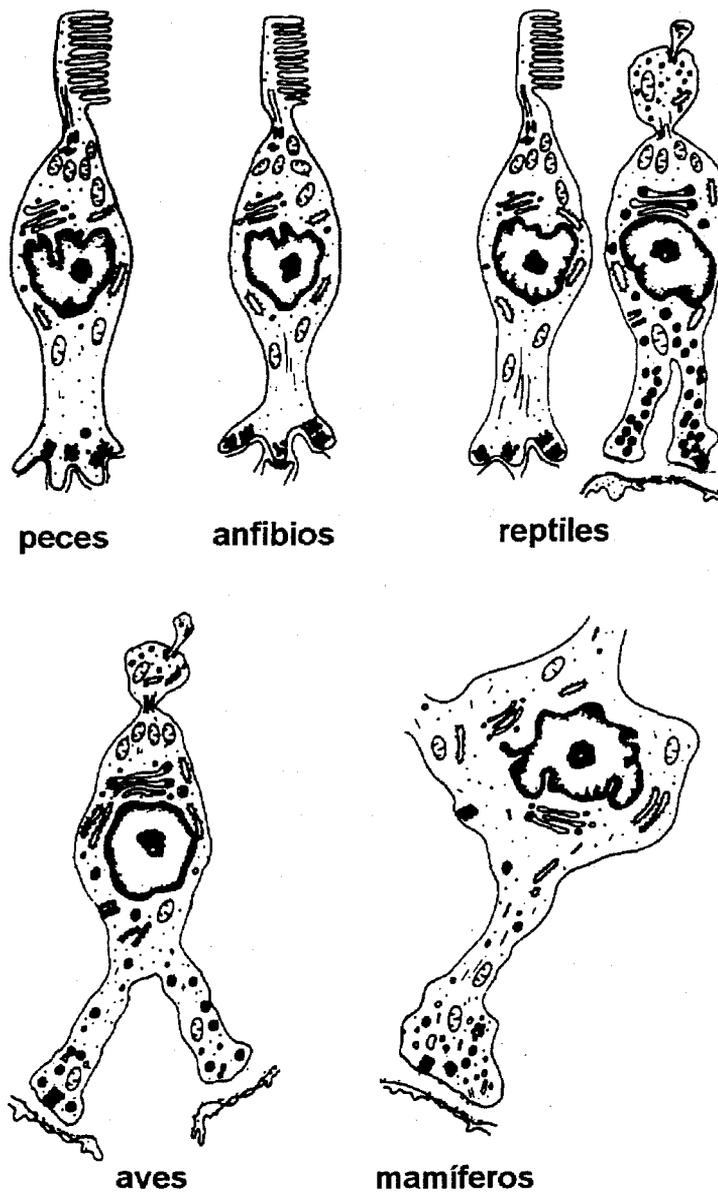


Figura 1. Células pineales de vertebrados mostrando la evolución filogenética desde fotoreceptores a células endocrinas. Tomada de "The Pineal and its Hormones" (R.J. Reiter, ed.), pp. 1-9. Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 1982.

Introducción

de los vertebrados inferiores se transforman gradualmente en fotorreceptores rudimentarios en aves, y después, en células neuroendocrinas en mamíferos. Así mismo, la inervación simpática aferente de la pineal, que se ha encontrado en vertebrados inferiores, se hace más pronunciada progresivamente en aves y mamíferos, lo que suple la pérdida de fotosensibilidad directa.

1.1.2. Similitudes entre la pineal y la retina

Estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos usando anticuerpos específicos han demostrado la existencia de proteínas comunes a la pineal y la retina (Tabla I), lo que sugiere una cierta similitud en los mecanismos de fototransducción entre los bastones de la retina y las células fotorreceptoras de la pineal de vertebrados inferiores y aves. El que algunas de las proteínas retinianas hayan sido encontradas también en pinealocitos de mamíferos, sin capacidad fotosensible, demuestra la relación filogenética entre los bastones de la retina y las células de la pineal. A continuación se exponen algunas de las similitudes encontradas entre estos dos tipos celulares.

La transducina, miembro de una familia de proteínas heterotriméricas que unen GTP y acopla la activación de la rodopsina por la luz a la estimulación de la fosfodiesterasa de GMPc en las membranas de los segmentos externos de los bastones, también ha sido encontrada en la pineal de vertebrados inferiores y aves. El antisuero para la subunidad α de la transducina de los segmentos externos de los bastones bovinos ha sido usado en estudios inmunocitoquímicos y ha identificado la proteína en la retina de mamíferos (humano, babuino, vaca, rata), de aves (codorniz), de vertebrados inferiores (rana, salmón, anguila y lamprea), en la pineal de aves (codorniz) y de vertebrados inferiores (rana, salmón, anguila y lamprea), así como en el órgano parapineal de salmón y lamprea (tabla I). Sin embargo, no se observó reacción inmunocitoquímica en la pineal de mamíferos (vaca, rata).

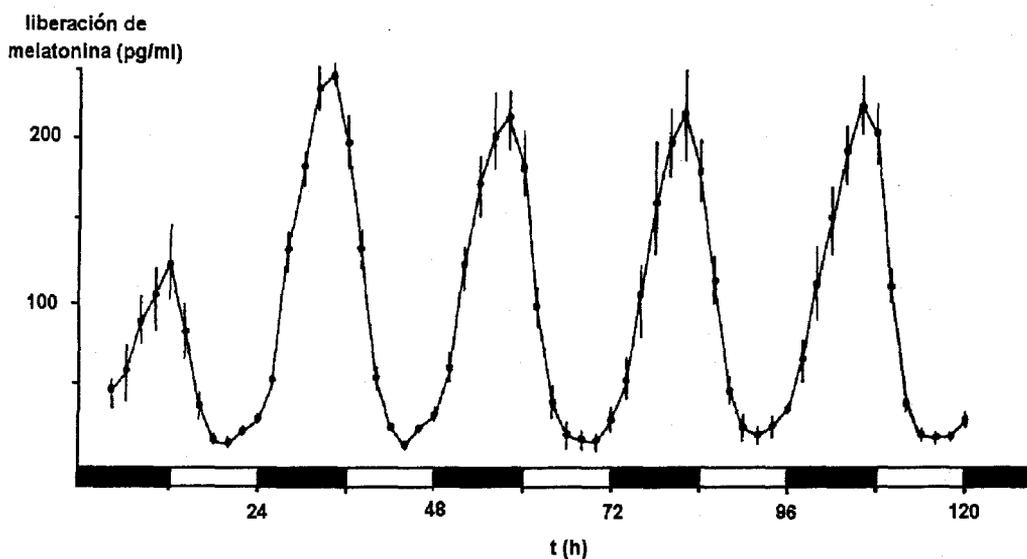
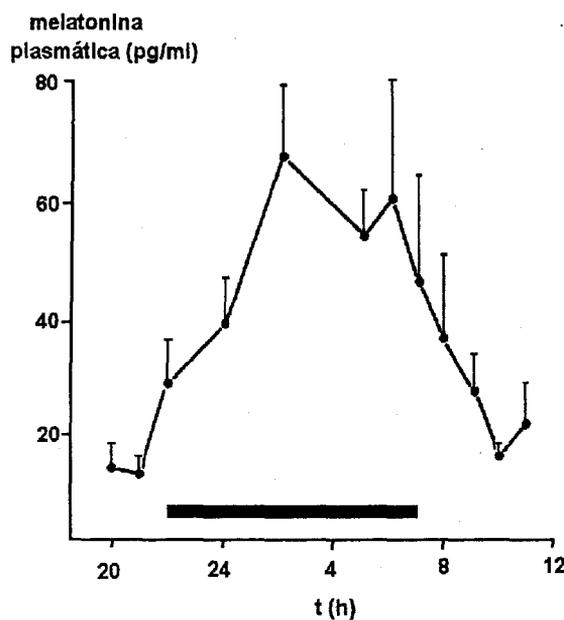
A**B**

Figura 2. Ritmos de secreción de melatonina. **A.** Liberación rítmica de melatonina de células pineales dispersas de pollo. Los puntos y las barras de error representan la media y e.e.m. de tres camaritas de cultivo expuestas a ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h y con un flujo de superfusión de 0.5 ml/h. (modificada de Robertson y Takahashi, 1988). **B.** Niveles medios de melatonina plasmática medidos a intervalos a lo largo de 24 horas en siete voluntarios humanos sanos (tomada de Reiter en "The Pineal Gland". pp 345-370 Ed. Raven Press, Nueva York, 1984). Las barras negras representan las horas de oscuridad.

Introducción

Los pinealocitos de pollo expresan otras proteínas "retinianas", incluyendo la arrestina (Collin, 1986), una proteína fotosensible similar a la rodopsina (Deguchi, 1981) y un canal dependiente de GMPc esencial en la fototransducción (1991). También se ha encontrado una opsina específica pineal que se ha denominado pinopsina (Okano, Yoshizawa, Fukada, 1994) (ver tabla I).

La reactividad de suero anti-retina con la glándula pineal de cobaya observada por distintos autores (Kalsow y Wacker, 1977) se debe en parte a la presencia en ambos tejidos de una proteína común denominada antígeno S. La inmunización con antígeno S induce pinealitis y uveitis autoinmunes inducidas experimentalmente en cobayas y ratas. Esta proteína, purificada en 1977 de extractos de retina (Dorey y Faure, 1977), está implicada en la fototransducción. Es idéntica a una proteína de 48 kD que se une a la rodopsina fosforilada y fotoexcitada, identificada en los segmentos externos de bastones bovinos. Se ha estudiado su localización inmunocitoquímica en la pineal de anguila, lucio, rana, lagartija, paserinos, ratón y hamster usando anticuerpos monoclonales fluorescentes, y la inmunoreactividad al antígeno S ha sido encontrada en todas las especies estudiadas (Collin y col, 1986). Así, el antígeno S junto con la rodopsina quinasa (Somers y Klein, 1984) constituyen ejemplos de proteínas retinianas presentes en la pineal de mamíferos (ver tabla I).

Alternativamente, ciertas proteínas "pineales" también se hayan en la retina. Los enzimas del metabolismo indólico, primeramente identificadas en la pineal, como la N-acetiltransferasa (NAT) y la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), han sido encontrados en la retina de todas las especies de vertebrados estudiadas (Hamm y Menaker 1981; Binkley, 1986). La melatonina, principal producto de secreción del metabolismo indólico en la glandula pineal, donde fue originalmente descubierta (Lerner, y col., 1958), está presente en la retina de distintas especies (Hamm y Menaker 1981; Pang, Yu, Tang, 1982). La función de la melatonina en la retina no está todavía bien

Tabla I. Características comunes entre los fotorreceptores de la retina y los pinealocitos en distintos tipos de vertebrados

| | RETINA | PINEAL | | |
|--|---------------|------------------------|----------------------------|-----------------|
| | | vertebrados inferiores | aves | mamíferos |
| tipo celular | fotorreceptor | fotorreceptor | fotorreceptor rudimentario | neuro-endocrina |
| opsinas | rodopsina | rodopsina | pinopsina | |
| antígeno S | si | si | si | si |
| rodopsina quinasa | si | si | si | si |
| α-transducina | si | si | si | |
| canal GMPc | si | | si | |
| NAT/HIOMT | si | si | si | si |
| melatonina | si | si | si | si |

Introducción

definida (no obstante, véase más adelante).

1.2. ANATOMÍA DE LA PINEAL

La posición anatómica de la pineal de mamífero es muy variable de una especie a otra, e incluso dentro de la misma especie. En 42 de 57 especies estudiadas (Pevet, 1983) la pineal es del tipo profundo, adyacente al techo del tercer ventrículo, como ocurre en la pineal humana (Figura 3), que junto con la habénula y la comisura posterior constituye el epitálamo, y descansa en la depresión entre los colículos superiores del mesencéfalo. Sin embargo, en algunos mamíferos, incluyendo la rata, las células pineales emigran dorsocaudalmente durante el desarrollo para formar la pineal distal o superficial que se localiza inmediatamente debajo del cráneo. La glándula pineal permanece conectada por un pedúnculo (que contiene fibras nerviosas, vasos sanguíneos y tejido conectivo) a la pineal profunda, que constituye menos de un 1 % del volumen total de la glándula.

1.2.1. Inervación

De la observación de algunas de las artísticas reproducciones del *Tratado del Hombre* de René Descartes, publicado en 1664, se desprende que éste autor presumió una relación anatómica entre el sistema visual y la glándula humana pineal (Figura 4), presunción acertada considerando la conexión nerviosa entre el sistema visual de mamíferos y la glándula pineal cuyo significado funcional está actualmente bien documentado.

En vertebrados inferiores la inervación de la pineal es fundamentalmente eferente

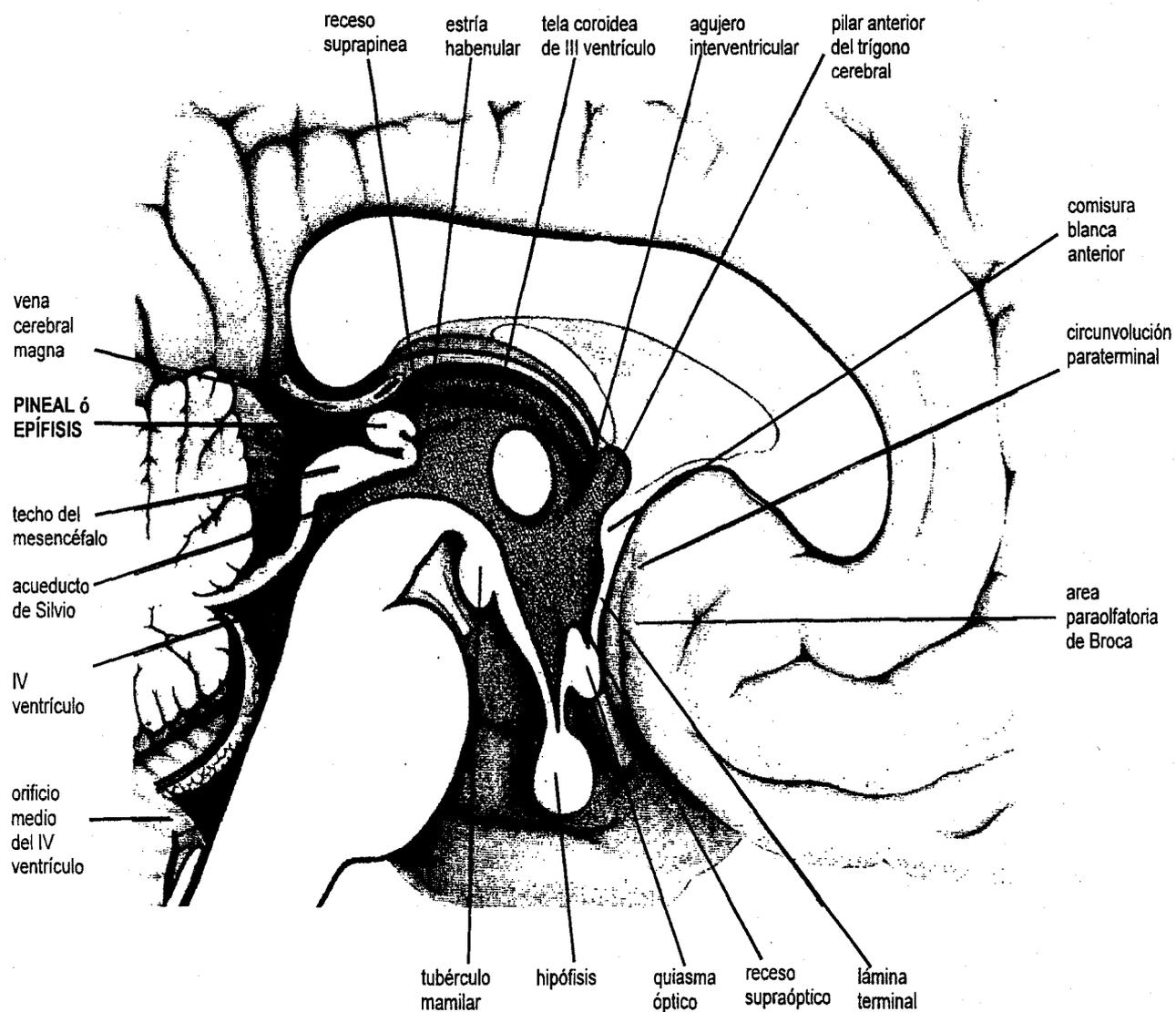


Figura 3. Parte de una sección sagital media de encéfalo humano que muestra la localización de la glándula pineal o epífisis y su entorno inmediato.

Introducción

o pinealofugal y la información procedente de los fotorreceptores pineales se transmite a diversas regiones del cerebro. A medida que se avanza en la escala filogenética, disminuye la importancia de esta inervación. Así, en aves, el número de fibras eferentes se reduce, mientras que en mamíferos adultos no se han encontrado fibras pinealófugas, con excepción del hurón, en el que hay fibras eferentes que inervan la habénula.

No hay evidencia de fibras aferentes a la pineal en peces, pero en reptiles se ha encontrado inervación noradrenérgica. En aves, la inervación simpática aferente se incrementa, y en mamíferos, la información lumínica llega a la pineal exclusivamente desde la retina, fundamentalmente a través del sistema nervioso simpático.

Hasta ahora, la inervación simpática de la glándula pineal ha sido la más estudiada y conocida, en mamíferos. No obstante, la glándula tiene también una inervación central comisural, una periférica parasimpática y otras conexiones nerviosas (ver más adelante), pero se desconoce el papel que desempeñan éstas en el control de su actividad.

1.2.1.1. *Inervación periférica simpática*

Como se muestra en la Figura 5, en ratas, hay fibras nerviosas que desde la retina alcanzan el núcleo supraquiasmático (Moore, 1978). Este núcleo proyecta hacia el núcleo paraventricular. Desde aquí, los axones forman el haz prosencefálico medial y probablemente hacen sinapsis con el complejo dorsal vagal u otros núcleos del tronco del encéfalo. Posteriormente, los axones alcanzan la médula espinal torácica donde conectan con la columna celular intermediolateral. Las fibras preganglionares de este núcleo espinal proyectan hacia el ganglio cervical superior (GCS). Aunque existen rutas alternativas, la mayoría de las fibras aferentes a los pinealocitos que proceden del GCS, lo hacen vía nervio carotideo interno y nervio coronario.

Parte de las fibras simpáticas penetran en la glándula pineal acompañando a los

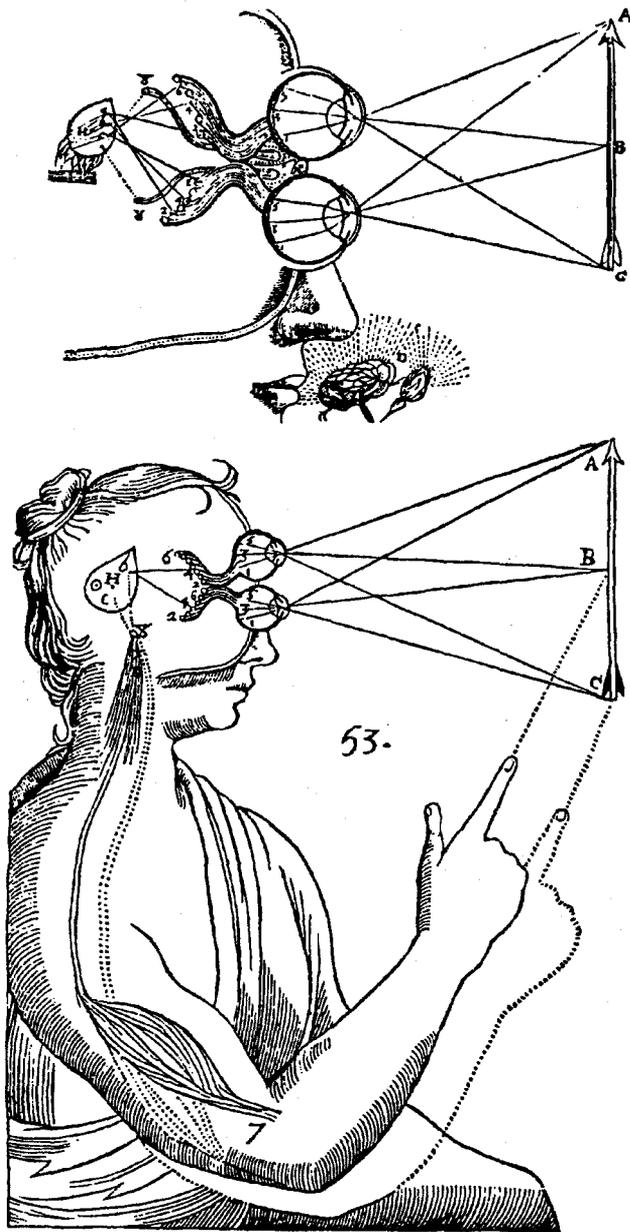


Figura 4. Figuras tomadas del "Tratado del Hombre" de René Descartes en las que se establece una relación entre el sistema visual y la glándula pineal (H)

Introducción

vasos sanguíneos cuyo flujo regulan, a lo largo del tejido conectivo que tabica la glándula. Otro grupo de fibras penetra en el polo dorsal de la glándula en múltiples sitios a través de la membrana externa limitante, en forma de haces o fibras únicas e inervan el parénquima. Estas fibras entran en contacto íntimo con los pinealocitos a través de varicosidades y botones terminales desde donde liberan catecolaminas. Sin embargo, no hacen sinapsis típicas, caracterizadas por engrosamientos especializados de la membrana pre-postsináptica, con las células pineales.

1.2.1.2. Inervación central

Además de la inervación simpática periférica, la glándula pineal de rata recibe inervación central a través de las fibras comisurales que penetran por el pedúnculo de la glándula. Las más numerosas son las fibras que proceden del núcleo de la habénula (comisura habenular), aunque existen otras fibras más dorsales que forman la comisura posterior. Estas fibras parecen llevar información lumínica (Shapiro y Salas, 1971; Dafny 1980) y, posiblemente, acústica y olfatoria como sugieren las conexiones funcionales (actividad eléctrica evocada) con centros acústicos y olfatorios (Dafny, 1977) que se abolen después de la sección del pedúnculo pineal (Pazo, 1981).

En el pedúnculo pineal, además de las fibras comisurales se ha descrito, en diferentes especies animales aunque no en humanos, la presencia de *fibras neurosecretoras* (Schneider, Semm, Vollrath, 1981). En ratas, algunas fibras contienen vasopresina y oxitocina (Buijs y Pevet, 1980).

1.2.1.3. Otras conexiones nerviosas

En el desarrollo de la glándula pineal humana existen fibras eferentes que constituyen el nervio pineal (Moller, 1978), y que se considera ontogénicamente equivalente del nervio pineal sensitivo de los peces y anfibios, capaz de transmitir

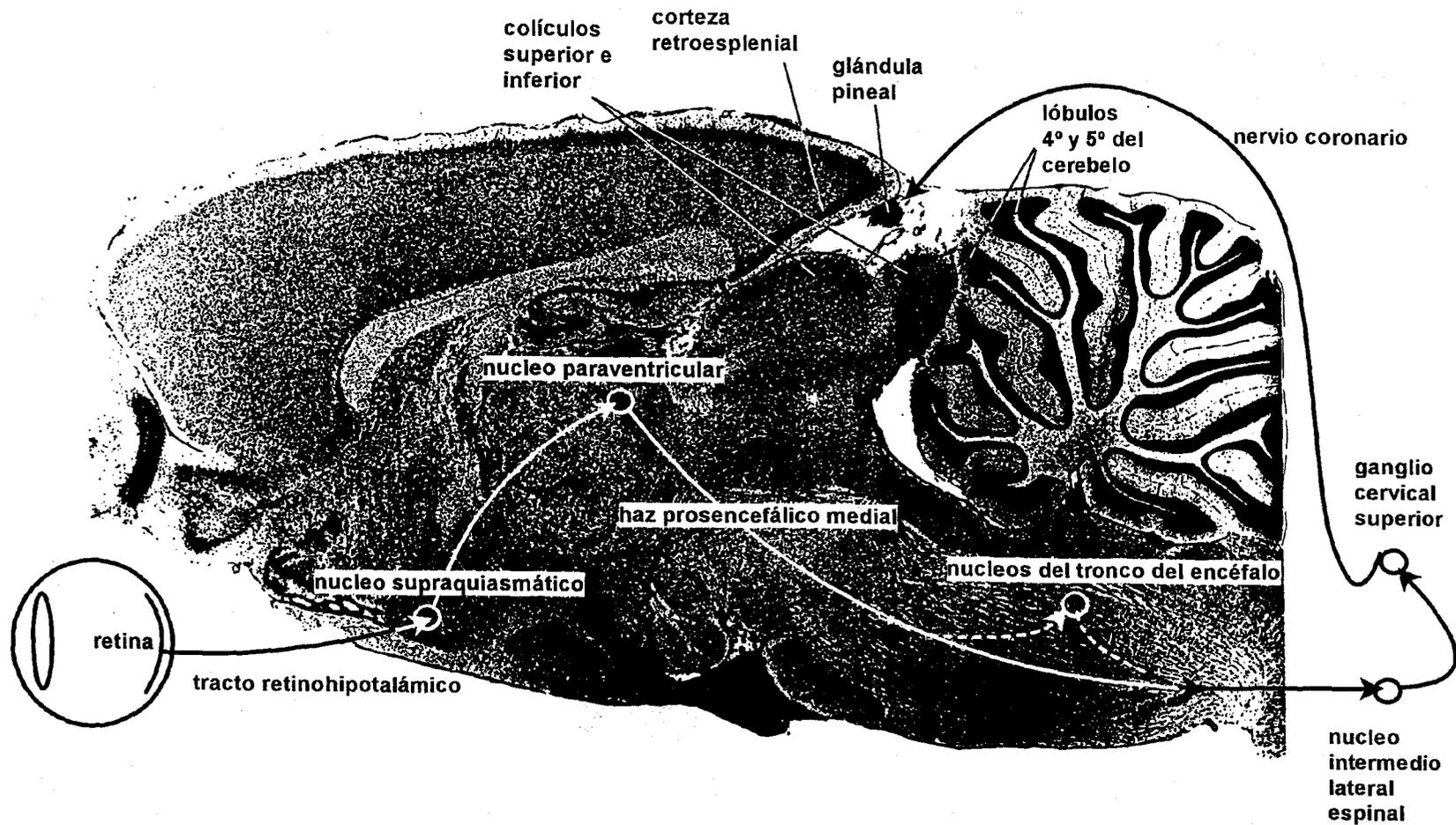


Figura 5. Representación semiesquemática de las relaciones anatómicas de la glándula pineal de rata y su inervación periférica simpática. Se muestra una sección sagital del cerebro de una rata adulta en un plano desplazado 0,4 mm de la línea media o plano de simetría del cerebro. La sección fue teñida con acetilcolinesterasa para obtener una mejor delineación de los núcleos y tractos de fibras (sección tomada de "The rat brain in stereotaxic coordinates", G. Paxinos y C. Watson, Ed. Academic Press, 1982)

Introducción

impulsos generados por la luz. Este nervio es una estructura efímera, que no se ha observado después del nacimiento, y cuyo significado funcional, si lo tiene, no se conoce.

Se duda si la inervación parasimpática de la glándula pineal es una característica regular, común a todos los mamíferos, y no se conoce su papel funcional. No obstante hay dos especies en las que se ha demostrado una clara inervación parasimpática: en monos macacos el nervio coronario es parasimpático (Kenny, 1961) y en conejos existen aferencias parasimpáticas que terminan en los pinealocitos (Romijn, 1975). En humanos, existen dos ganglios extrapineales, el de Marburg y Pastori, que inervan la glándula pineal y que se suponen de naturaleza parasimpática. En ratas, se ha puesto de manifiesto la existencia de receptores muscarínicos funcionales en la membrana de los pinealocitos (Laitinen, Torda y Saavedra, 1989).

1.3. LA PINEAL COMO GLÁNDULA ENDOCRINA

Aunque los pinealocitos se han desarrollado filogenéticamente de células fotorreceptoras, en mamíferos la glándula pineal tiene un papel secretor produciendo indolaminas, caracterizadas por poseer un anillo indol, y, posiblemente, hormonas peptídicas.

1.3.1. El pinealocito tiene una ultraestructura neurosecretora

El cuerpo celular de los pinealocitos posee retículo endoplásmico, liso y rugoso, junto con un aparato de Golgi bien desarrollado, gotitas de lípidos y numerosas mitocondrias, como corresponde a células con función secretora. En ocasiones se encuentra un extraño orgánulo, formado por grupos de microtúbulos, lamelas perforadas

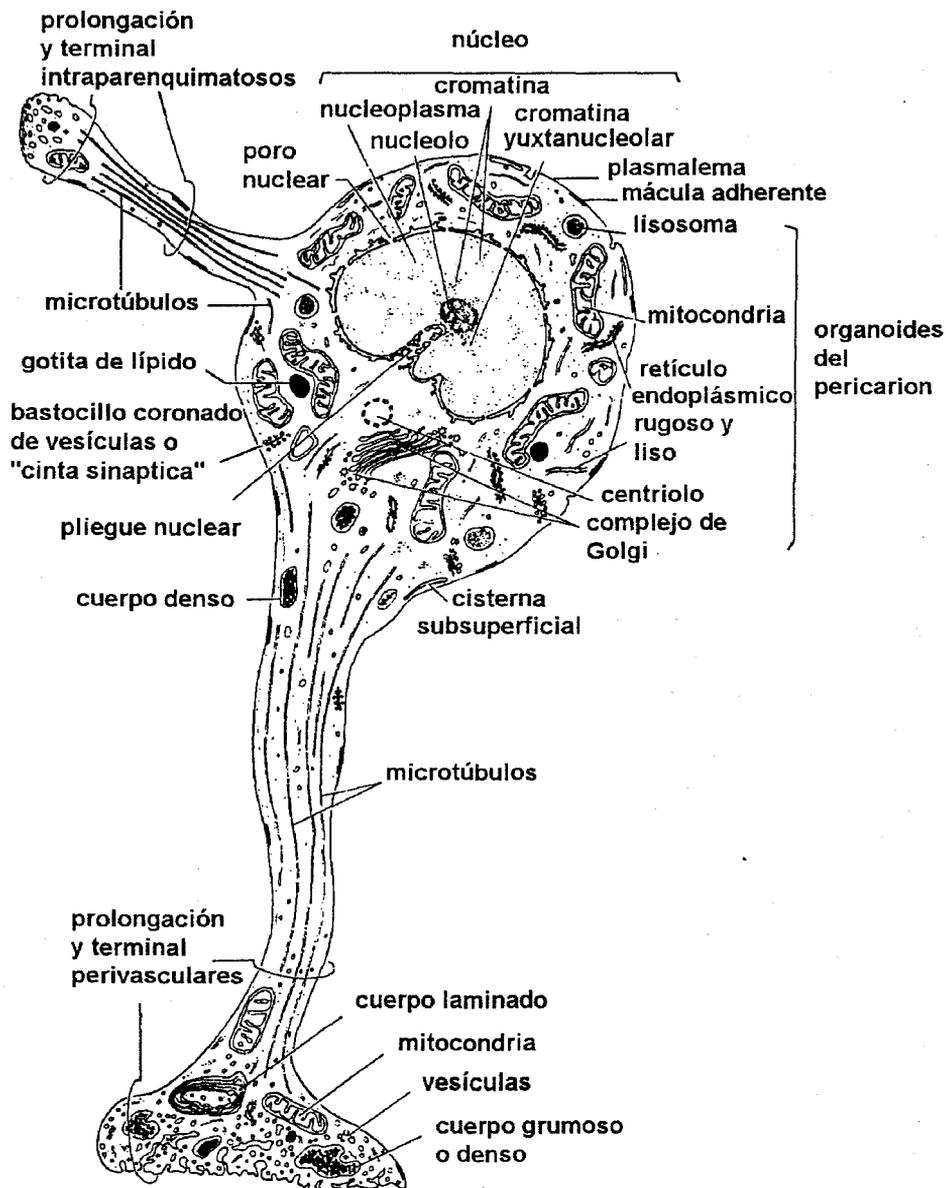


Figura 6. Pinealocito idealizado a partir de micrografías electrónicas. Tiene un núcleo central con nucleolos. En el citoplasma se localizan largos microtúbulos que se extienden en todas direcciones del cuerpo celular, pero paralelos al eje axial de las prolongaciones citoplasmáticas. Tiene un retículo endoplásmico liso muy abundante. Un gran complejo de Golgi se encuentra próximo al núcleo y al par de centriolos. Hay pequeñas vesículas de núcleo denso a lo largo de la célula, numerosas mitocondrias, algunos lisosomas y gotitas de lípidos. Posee "barras sinápticas" al igual que las células fotorreceptoras de la retina, pero carentes, generalmente, de elementos postsinápticos. Las prolongaciones citoplasmáticas cortas se hallan entremezcladas con las prolongaciones nerviosas y gliales. Las prolongaciones mayores terminan a menudo en la proximidad de pequeños vasos sanguíneos del tejido interlobulillar. (reproducción tomada de L. Weiss, "HISTOLOGY-Cell and Tissue Biology", Elsevier Biomedical, Nueva York, 1983)

Introducción

unidas a retículo endoplásmico rugoso, y gotitas de lípidos (Figura 6). Estos orgánulos denominados cuerpos laminados se cree que pueden intervenir en el proceso de secreción. Sin embargo, tienen un significado todavía enigmático (ver figura 6).

Proyectándose desde el cuerpo celular, que tiene un núcleo esférico, oval o lobulado, salen una o más prolongaciones tortuosas en cuyo interior hay microtúbulos ordenados paralelamente. Estas prolongaciones terminan en pequeñas dilataciones cerca de los capilares sanguíneos, o menos frecuentemente, próximas a células del epéndimo del receso pineal. Estos botones terminales tienen retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y vesículas con un núcleo electrónicamente denso. Las vesículas almacenan, probablemente, hormonas monoamínicas y polipeptídicas .

Otra característica de los pinealocitos de algunos mamíferos es la presencia de estructuras típicas de las sinapsis en barra, similares a las existentes en fotoreceptores de la retina y que contienen a ambos lados vesículas con neurotransmisores.

Los pinealocitos además de microfilamentos y algunos microtúbulos, muestran a veces cilios con un modelo microtubular 9+0, presentes también en otras células endocrinas, como la hipófisis. Los pinealocitos tiene además uniones en hendidura que permiten el acoplamiento eléctrico y máculas adherentes que proporcionan conexión mecánica entre los mismos.

1.3.2. Síntesis de indolaminas pineales

Lerner y colaboradores (Lerner, Takahashi, Lee y Mori, 1958) aislaron e identificaron la estructura del principal producto de secreción pineal, la melatonina. Dado que ésta hipopigmentaba la piel de la rana disminuyendo el contenido de *melanina* de los melanocitos, y que era un derivado metoxi de la *serotonina*, Lerner y asociados decidieron llamarle *mela-tonina*. Su descubrimiento en 1958 atrajo la atención de notables científicos que identificaron la vía enzimática para la síntesis de melatonina y

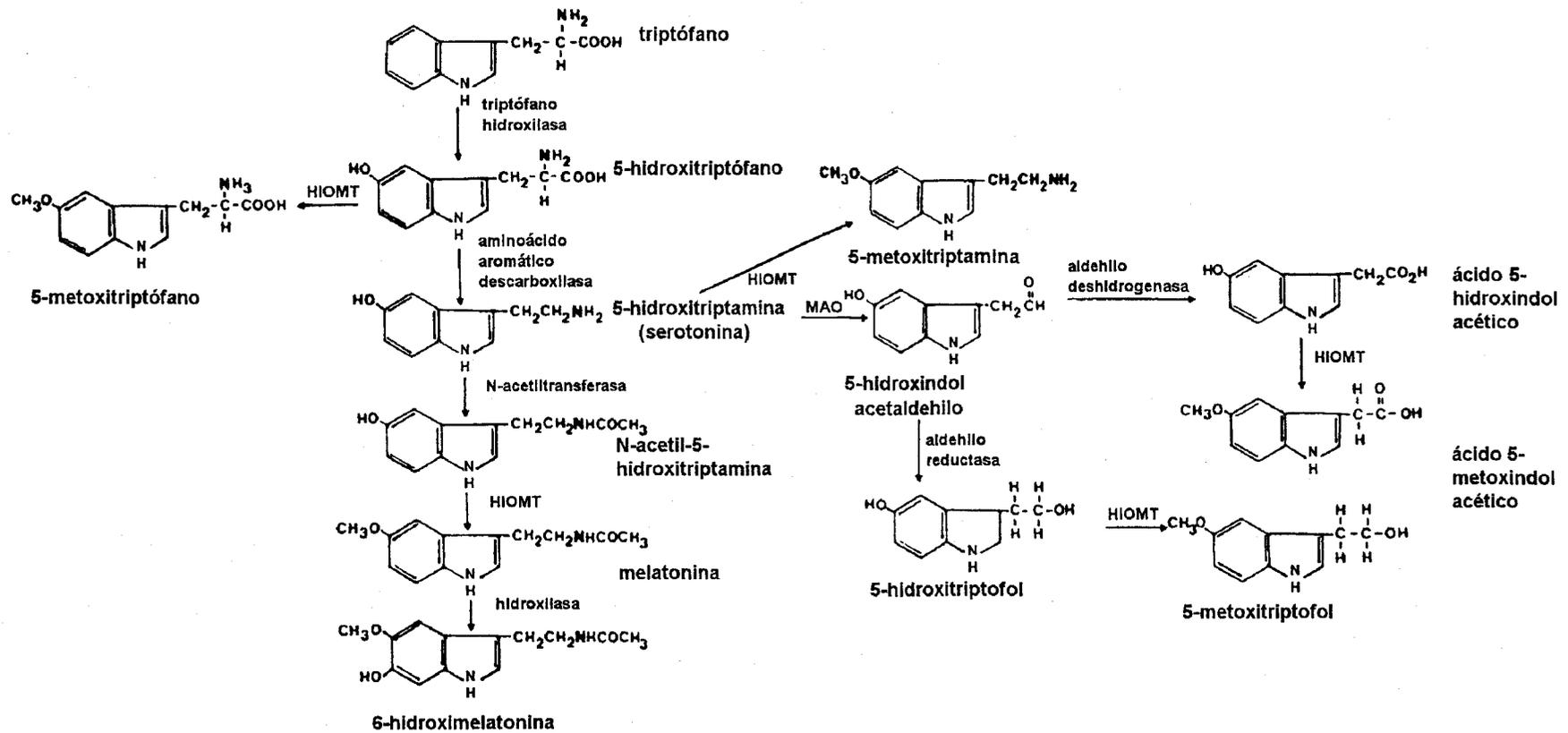


Figura 7. Ruta bioquímica de la síntesis de melatonina y otras indolaminas pineales. HIOMT = hidroxindol-o-metiltransferasa; MAO = monoamino oxidasa (según M. Ebadi. Tomado de R. Reiter, "The Pineal Gland" pp 1-37. Ed. Raven Press, Nueva York, 1984)

Introducción

confirmaron la presencia de esta maquinaria enzimática en la pineal. La biosíntesis de melatonina y otras indolaminas (Bosin, 1978; Vollrath, 1981; Ebadi, 1984; King y Steinlechner, 1985), que se resume en la Figura 7, comienza con la captación de *triptófano* de la circulación. Una hidroxilasa le añade un hidroxilo en posición 5 del anillo indol, para formar *5-hidroxitriptófano*. Una descarboxilasa elimina un grupo carboxilo de la molécula dando lugar a la *5-hidroxitriptamina* (serotonina). Al extremo amino del radical de la serotonina, una *N*-acetiltransferasa (NAT) une un grupo acetilo, originando *N*-acetil-*5-hidroxitriptamina*, y una metiltransferasa (Hidroxiindol-*o*-metiltransferasa, HIOMT) transfiere un grupo metilo al hidroxilo del anillo indol, dando lugar a *melatonina*.

Aunque la mayor parte de la serotonina sintetizada es convertida a melatonina, existen diferentes rutas metabólicas alternativas (figura 7). La serotonina puede ser convertida por una monoaminoxidasa (MAO) y una aldehído deshidrogenasa en *ácido 5-hidroxindolacético*. También la serotonina puede convertirse en *5-metoxitriptofol* por una aldehído reductasa y una hidroxindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT). Por último, la serotonina puede ser convertida a *5-metoxitriptamina* por acción de la HIOMT.

1.3.2.1. *Productos indólicos de secreción*

Aunque la melatonina es la hormona mejor conocida, las células de la pineal secretan otras indolaminas. El *5-metoxitriptofol*, cuya concentración en la glándula pineal es 60-170 veces mayor que la de melatonina (Pevet, Balemans y Reuver, 1981) es secretado a la circulación con un patrón circadiano paralelo a la melatonina y posiblemente pulsátil (Mullen y col., 1981).

Se ha sugerido que la serotonina, cuya concentración es mayor en el tejido pineal que en cualquier otro parénquima (0.5 mM) y sigue un ritmo circadiano inverso al de la melatonina con concentraciones en la glándula elevadas durante el día y descendidas durante la noche (Quay, 1963), o alguno de sus productos (p.e., *5-metoxitriptamina*),

pueda ejercer una hipotética actividad endocrina. Experimentos *in vitro*, han mostrado que la incubación de tejido pineal en presencia de agonistas muscarínicos, incrementa la actividad de la proteína quinasa C y la liberación de serotonina (Finocchiaro y Téllez-Iñón, 1991).

1.3.3. Hormonas peptídicas

Diferentes péptidos han sido también aislados de la pineal. El que más atención ha recibido ha sido la *arginina vasotocina* (AVT), descubierto en la pineal bovina (Milcu, Pavel, Neacsu, 1963). Previamente este péptido había sido encontrado solamente en la neurohipófisis de vertebrados no mamíferos. Después de varios años de controversia, la existencia de AVT en la pineal de mamíferos fue aceptada por la mayoría de los pinealólogos. Sin embargo, estudios con cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y radioinmunoensayos con anticuerpos muy específicos, han puesto en duda de nuevo la presencia de AVT en pineales de mamíferos. La controversia puede deberse en parte a dificultades técnicas en la identificación de péptidos y, en parte, a variaciones circadianas y estacionales (Prechel, Audhya, Schlesinger, 1983).

Además de AVT, se han identificado en la pineal de mamíferos *arginina vasopresina* y *oxitocina* así como sus respectivas neurofisinas. Existen evidencias de que fibras que inervan la pineal procedentes de la comisura habenuar, contienen estos péptidos. Además, se han descubierto en la pineal otros péptidos como la *treonil-serinilisina*, tripéptido miembro de la familia de péptidos derivados de la proopiomelanocortina (p.e., ACTH, α -MSH y β -endorfina), y componentes del *sistema renina angiotensina*, como indica la presencia de actividad renina, del enzima convertidor e inmunoreactividad a la angiotensina II. También se han descrito péptidos similares a la *hormona liberadora de tirotrópina* (TRH) y *hormona liberadora de gonadotropina* (GnRH) que comparten con sus homólogas hipotalámicas inmunoreactividad pero que tienen propiedades químicas

Introducción

diferentes.

1.3.4. Regulación de la secreción de melatonina por NA y relación con el fotoperiodo

La secreción de melatonina está regulada por la actividad de las neuronas simpáticas que inervan la pineal. En pinealocitos, la unión de la noradrenalina (NA) liberada por las terminaciones simpáticas a los receptores adrenérgicos del tipo α y β produce, en último termino, estimulación de la N-acetiltransferasa (NAT), enzima limitante de la biosíntesis de melatonina (figura 7).

La actividad de la NAT y la concentración de su substrato, serotonina y su producto, melatonina, en la pineal fluctúan con un ritmo circadiano, sincronizado con el ciclo luz-oscuridad ambiental. En todas las especies estudiadas, sean de actividad diurna o nocturna, el máximo de actividad de la NAT y de secreción de melatonina ocurre durante las horas de oscuridad (figura 2). La secreción de melatonina es pulsátil (Figura 8 A), en la mayoría de las especies coincide con la máxima actividad de las fibras simpáticas que inervan la pineal, y puede ser inducida mediante estimulación eléctrica del ganglio simpático cervical superior (Figura 8 B). En mamíferos, elementos cruciales para la sincronización de los ritmos biológicos son la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático (NSQ), cuya actividad oscila con un ritmo circadiano endógeno. Así, la síntesis de melatonina está controlada por el SNC, a través del NSQ y de las fibras periféricas noradrenérgicas que aferen a la pineal.

1.3.4.1. La estimulación β -adrenérgica

La liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas en la glándula pineal induce un gran incremento nocturno de la síntesis de melatonina, estimulando la serotonina N-acetil-transferasa (NAT) 30-70 veces (Klein,

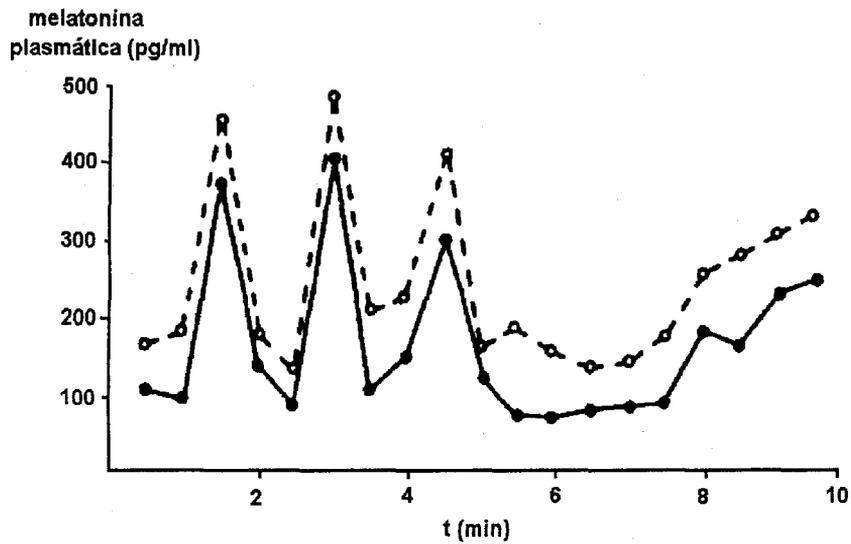
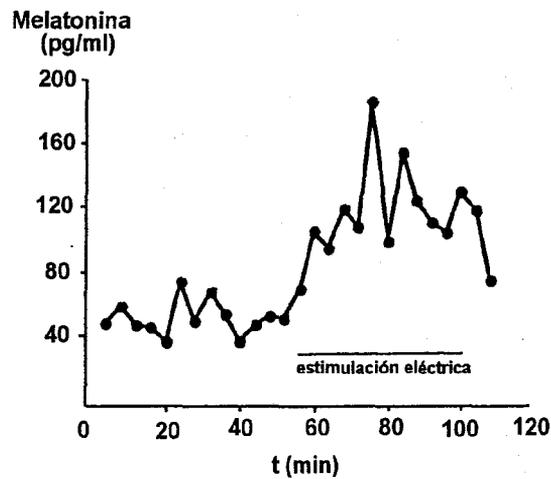
A**B**

Figura 8. Variaciones a corto plazo (ultradianas) en los niveles de melatonina plasmática. **A.** Concentración de melatonina en muestras de sangre tomadas de la vena yugular izquierda (círculos vacíos) y derecha (círculos rellenos) de oveja. (tomada de English y col, 1987). **B.** Cambios en los niveles de melatonina plasmática medidos a nivel del seno confluyente de un conejo antes y después de estimulación eléctrica del ganglio cervical superior (0.5 ms, 300 Hz, trenes de pulsos de 8 s a intervalos de 20 s) (tomada de Chan, Cheung y Pang, 1989).

Introducción

1970), a través de un incremento de los niveles citosólicos de AMP cíclico (Klein, 1978). Como se ilustra en el esquema de la Figura 9, el incremento del AMPc en pinealocitos inducido por NA está mediado por receptores adrenérgicos β que activan la adenilato ciclasa. La estimulación β -adrenérgica también induce un incremento de los niveles de GMP cíclico (Klein, 1981).

1.3.4.2. La estimulación α_1 -adrenérgica y la potenciación de la síntesis de nucleótidos cíclicos

La activación de los receptores adrenérgicos α_1 en células pineales estimula la hidrólisis de un fosfolípido constituyente de membrana, el fosfatidilinositol, a través de la activación de la fosfolipasa C. El fosfatidilinositol da lugar a la liberación de dos segundos mensajeros, el 1,4,5 inositol trifosfato y el diacilglicerol, IP₃ y DAG, respectivamente (figura 9).

La activación de receptores α_1 -adrenérgicos potencia la activación de AMPc y GMPc inducida por estimulación β -adrenérgica (Klein, 1981). La estimulación β -adrenérgica produce un incremento de 6 y 2 veces el contenido de AMPc y GMPc respectivamente. La estimulación α_1 -adrenérgica no tiene efecto alguno en modificar las concentraciones de estos nucleótidos cíclicos. La activación conjunta de los receptores α y β incrementa 60 y 400 veces el contenido basal de AMPc y GMPc, respectivamente (Vanecek y col, 1985).

La interacción sinérgica entre la estimulación de receptores α y la estimulación de los β se produce a través de la activación de una proteína quinasa C (figura 9). Se ha demostrado que la síntesis de AMPc y GMPc, por estimulación de la adenilato ciclasa y guanilato ciclasa, respectivamente, inducidas por activación de los receptores β -adrenérgicos, es potenciada dramáticamente por la proteína quinasa C (Sugden y col, 1985; Ho, Chik, Klein, 1987).

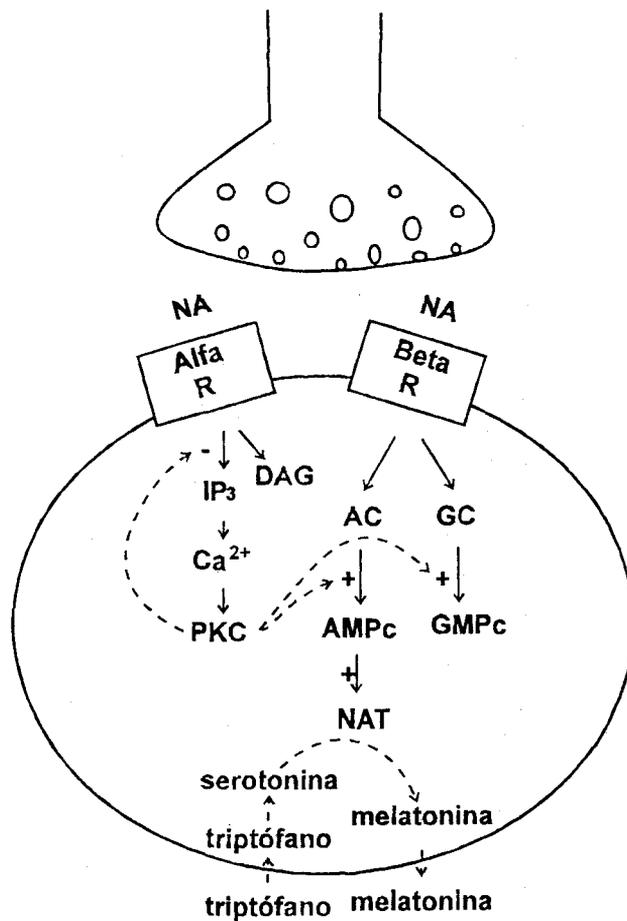


Figura 9. Regulación de la síntesis de melatonina a través de receptores adrenérgicos. NA, noradrenalina; Alfa R, receptor α -adrenérgico, Beta R, receptor β -adrenérgico; DAG, diacilglicerol; IP₃, 1,4,5 fosfoinositol; Ca²⁺, calcio iónico; PKC, proteina quinasa C; AC, adenilato ciclasa; GC, guanilato ciclasa; AMPc, adenosina monofosfato ciclico; GMPc guanosina monofosfato ciclico; NAT, serotonina N-acetiltransferasa.

Introducción

Para que ocurra esta potenciación es esencial la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo, pues en ausencia de éste (quelación con EGTA) o inhibición de la entrada con bloqueantes inorgánicos (La^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+}), se reduce marcadamente la respuesta de nucleótidos a la NA, mientras que la potenciación α_1 es reproducida con agentes que elevan la concentración citosólica de Ca^{2+} (alto K^+ , oubaina, ionomicina y A23187). El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por NA se produce a través de receptores α_1 -adrenérgicos puesto que se induce por fenilefrina (PE, agonista α_1) y se previene por prazosín (antagonista α_1), mientras que isoproterenol (agonista β) y propanolol (antagonista β) apenas tienen efecto sobre los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Sugden y col. han demostrado que la entrada de Ca^{2+} no se bloquea por nifedipina (1 μM), aunque si la inducida por despolarización con alto K^+ (Sugden, Sugden, Klein, 1987). El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es suficiente para inducir activación de la proteína quinasa C (Ho y col., 1988).

Además de la implicación de la proteína quinasa C en la acumulación de nucleótidos inducida por NA, dado que el tratamiento con un activador de la proteína quinasa C inhibe el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por agonistas α y la acumulación de nucleótidos, parece que la proteína quinasa C está implicada en un mecanismo de autoregulación negativa (ver figura 9), desensibilizando la vía de la estimulación α_1 (Sugden y col., 1988).

1.3.4.3. El papel de los nucleótidos cíclicos

El incremento de los niveles de AMPc aumenta la actividad de la NAT (Klein y col., 1978) actuando a tres niveles diferentes (Zatz, 1982). Primero, los niveles elevados de AMPc inducen la transcripción del gen que codifica la serotonina *N*-acetil transferasa (NAT). Segundo, estimulan la traducción del mensajero que da lugar a NAT. Y tercero, mantienen la NAT en su forma activa. Así, las fluctuaciones circadianas de la inervación noradrenérgica simpática determinan fluctuaciones circadianas en los niveles de AMPc

que hace que la expresión y actividad del enzima limitante para la síntesis de melatonina, NAT oscile con una periodicidad de 24 h y determinan que la glándula pineal en mamíferos exprese un ritmo circadiano en la producción de la hormona melatonina (Figura 2 B). Adicionalmente, la actividad de la HIOMT es estimulada por NA y sometida a control circadiano también.

El papel funcional de la gran acumulación de GMPc que la estimulación noradrenérgica induce, incluso mayor que la de AMPc, no se conoce hasta el momento.

1.3.4.4. Regulación circadiana de la expresión génica de NAT

Las fluctuaciones circadianas en el control de la secreción también se han puesto de manifiesto a nivel molecular en la glándula pineal. La expresión génica de NAT es rítmica y está sometida a una doble regulación adrenérgica, positiva y negativa, inducida por AMPc (Figura 10). Recientemente se ha demostrado que el AMPc induce un potente elemento represor, ICER ("inducible cAMP early repressor"), de la transcripción de NAT (Stehle y col, 1993). La expresión de ICER, inducida por AMPc, muestra un ritmo circadiano con un retraso de 6-9 horas con respecto a la expresión génica nocturna de NAT, también inducida por AMPc.

Así, la expresión génica de NAT estaría sometida a una doble regulación circadiana inducida por AMPc, por un lado positiva a través de la fosforilación y activación con proteína quinasa A de proteínas reguladoras positivas de la expresión del gen CREM ("cyclic AMP-responsive element modulator") cuyo producto de expresión es un regulador positivo de la síntesis de NAT, y por otro induciendo, con un retraso de 6-9 h, la expresión de un potente elemento represor de la expresión de NAT (ICER) que inhibe la expresión de NAT directamente o a través de la inhibición del elemento regulador CREM.

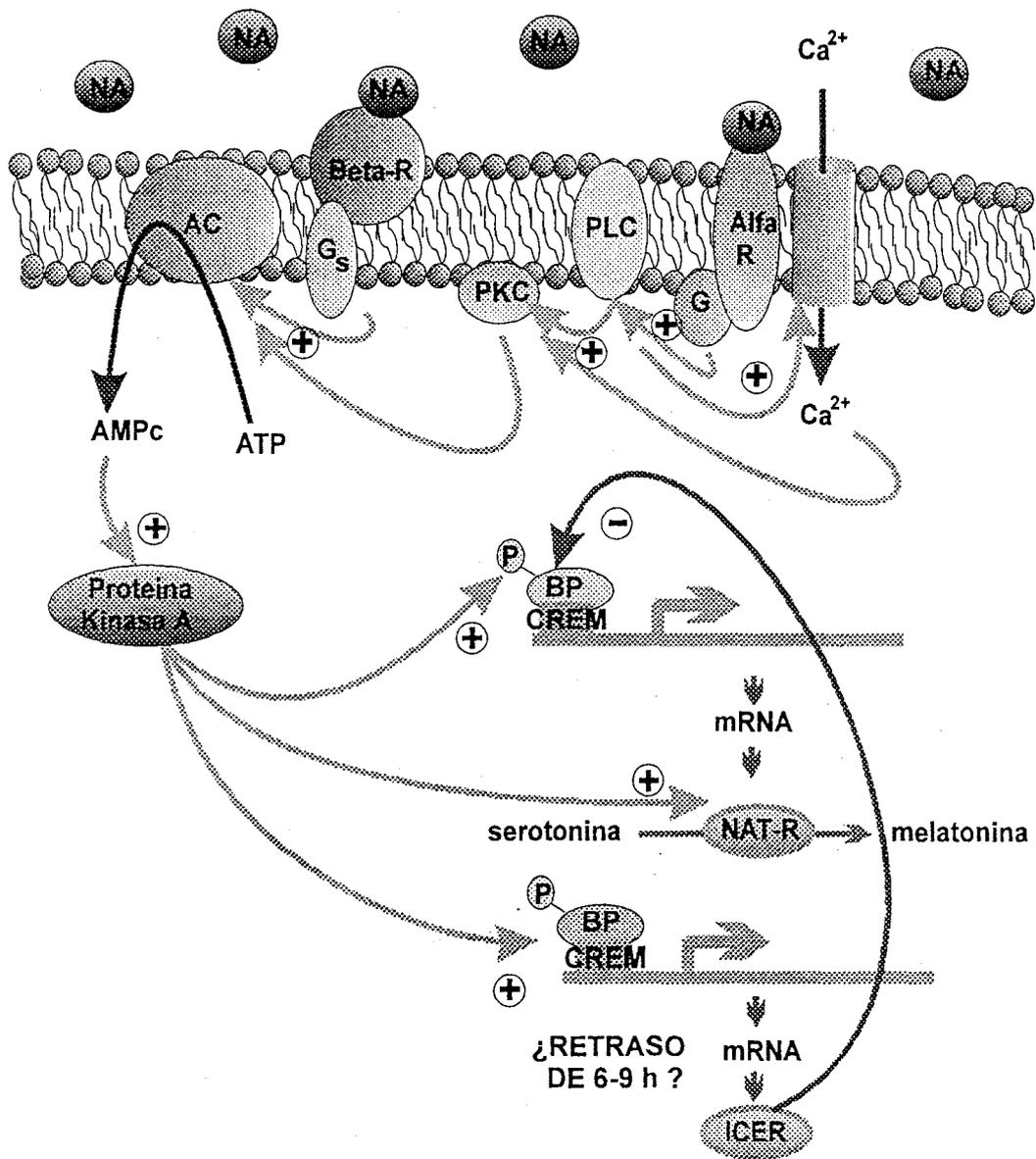


Figura 10. Esquema de la regulación adrenérgica de la biosíntesis de melatonina a nivel molecular. AC, adenilato ciclasa. G, proteína G; NA, noradrenalina; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C, BP proteína que se une a elementos reguladores, CREM, gen elemento modulador inducido por AMPc; ICER, represor temprano inducible por AMPc; NAT-R, regulador de la expresión de N-acetiltransferasa. Modificada de Zazt, 1982 y Klein, 1992.

1.3.5. Regulación de la síntesis de melatonina por otros receptores de membrana

La glándula pineal posee una plétora de receptores para distintos neurotransmisores (Figura 11). No todos estos receptores identificados en la pineal están implicados en la síntesis de melatonina. Por ejemplo, ni la sustancia P ni la somatostatina afectan la actividad de la NAT ni participan en la biosíntesis de melatonina (Ebadi y Govitrapong, 1987).

Tampoco todos los receptores identificados en la glándula pineal se localizan en la membrana del pinealocito. En la pineal de ave, p.e., la síntesis de melatonina es inhibida con agonistas α_2 -adrenérgicos actuando sobre receptores específicos, que también se localizan en la glándula pineal de mamíferos (Simoneaux, Ebadi y Bylund, 1991). No obstante, se cree que los receptores α_2 -adrenérgicos no estarían ubicados en la membrana del pinealocito sino en el terminal nervioso simpático (Cardinali y col., 1987).

Otros receptores, como los dopaminérgicos (D_1 y D_2) tienen efectos opuestos sobre la actividad de la NAT, dependiendo de la concentración, inhibiéndola a $0.1 \mu\text{M}$, no teniendo efecto a concentraciones entre $1-10 \mu\text{M}$ y estimulándola a concentraciones mayores de $10 \mu\text{M}$ (Govitrapong, 1989). La activación de receptores gabaérgicos en la glándula pineal bovina, no altera la actividad basal de la NAT, pero inhibe la estimulación de la NAT inducida por NA (Chan y Ebadi, 1980). Similarmente, L-glutamato, probablemente a través de receptores metabotrópicos, inhibe la activación de la NAT de un modo dosis dependiente (Govitrapong y Ebadi, 1988). La activación de los receptores opiáceos existentes en la glándula pineal incrementan la actividad de la NAT (Govitrapong, Pariyanonth y Ebadi, 1992). Además, se ha identificado la existencia de otros receptores, de serotonina (S_2), etc., cuyo papel funcional no es aún conocido.

En la glándula pineal de rata y cordero se han descrito sitios de unión de alta

Introducción

afinidad (K_d 13-18 pM) y baja capacidad (32 fmol/mg de proteína) para agonistas colinérgicos muscarínicos (Taylor y col, 1980). Un reciente estudio autoradiográfico ha revelado unión de un ligando muscarínico, 3H-(N)metilescopolamina en tejido pineal de ratas fetales (Schlumpf y col., 1987). Los receptores muscarínicos de la glándula pineal son funcionantes, carbacol, un agonista muscarínico estimula la hidrólisis y el recambio del fosfoinositol (PI) y esta estimulación puede ser bloqueada con un antagonista muscarínico selectivo de los receptores M_1 (Laitinen, Torda, Saavedra, 1989). La activación de los receptores colinérgicos muscarínicos de la glándula pineal bovina inhibe la actividad de la NAT (Phansuwan-Pujito, Govitrapong y Ebadi, 1991). La aplicación de agonistas muscarínicos colinérgicos, incrementa la producción metabólica de 5-hidroxitriptófano y serotonina (Finocchiaro y col., 1989) y aumenta la actividad de la proteína quinasa C en glándula pineal de rata (Finocchiaro y Tellez-Iñón, 1991).

1.3.6. Fenómenos eléctricos de membrana

Contrasta lo poco que se sabe sobre el papel que desempeñan los fenómenos eléctricos de membrana en la transducción neuroendocrina en pinealocitos, a nivel celular, en relación al conocimiento que se tiene, incluso a nivel molecular, de la regulación de la síntesis de su principal hormona.

Algunas evidencias indican que NA puede inducir hiperpolarización en el pinealocito (Sakai y Marks, 1972, Freschi y Parfitt, 1986). Estos autores mostraron que la amplitud de la hiperpolarización, medida con microelectrodos de registro intracelular, es directamente proporcional a la concentración de NA empleada. Por otro lado, se ha mostrado que la estimulación con NA produce un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico en las células pineales mediado por receptores adrenérgicos del tipo α_1 (Sugden, Sugden y Klein, 1987). Por último, registros de canal único con la técnica de "patch-clamp" en configuración de microárea de membrana *in situ*, han puesto de

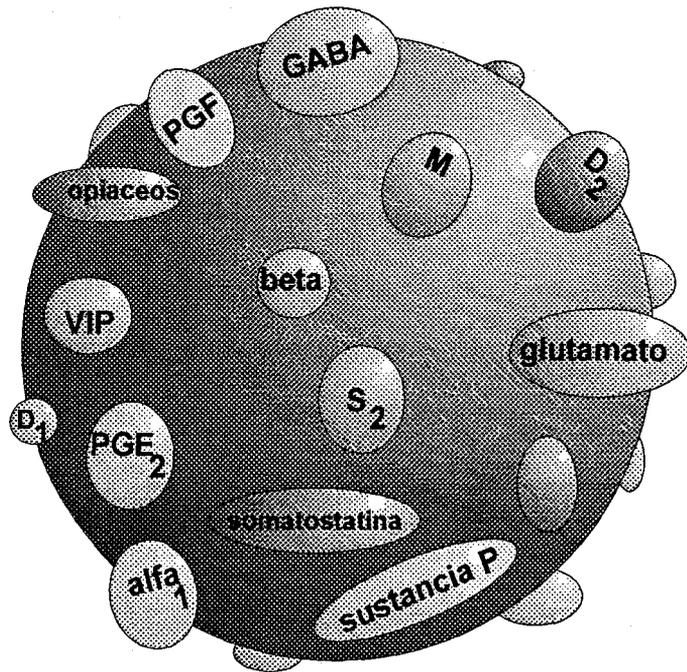


Figura 11. Receptores de membrana identificados en la glándula pineal. muscarínicos (M), α_1 -adrenérgicos (Alfa-1), β -adrenérgicos (Beta), serotoninérgicos (S_2), dopaminérgicos (D_2), prostaglandínicos PGF_1 y PGE_2 , opioceos, glutamatérgicos, gabaérgicos, de VIP (peptido intestinal vasoactivo), de somatostatina, de sustancia P, etc.

Introducción

manifiesto que NA induce la activación de corrientes unitarias *hacia fuera* de gran conductancia (Halperin y Yeandle, 1987), y registros en modalidad de micrarea de membrana escindida con la misma técnica, han demostrado que la exposición de soluciones de alto Ca^{2+} en el lado interno de la membrana celular incrementa la probabilidad de apertura de un canal de K^+ (Ceña y cols, 1991).

1.3.7. Acciones de la melatonina

La primera observación del papel funcional de la melatonina fue su capacidad para hipopigmentar la piel de los anfibios al producir contracción de los gránulos de melanina (McCord y Allen, 1987). Sin embargo, esta acción bien documentada en anfibios parece no tener lugar en la piel de los mamíferos.

En mamíferos, el efecto de la melatonina sobre la actividad reproductora ha sido demostrada en muchas especies. La melatonina actuando sobre el eje neuroendocrino-reproductor regula la periodicidad en el apareamiento de especies sometidas al fotoperíodo natural (Reiter, 1980). Concretamente sincroniza el ciclo anual reproductivo de los reproductores de días largos y de días cortos y aunque en algunas especies (p.e., hamster sirio) la melatonina tiene efectos antigonadotróficos, en otros (p.e., la oveja) son progonadotróficos. El ritmo de melatonina es un mensaje endocrino con capacidad de modificar la actividad reproductora dependiendo de la capacidad de respuesta del sistema en el momento que recibe la información.

La melatonina modula la secreción de todas las hormonas clásicas de la adenohipófisis. Así, además de prolactina, hormona folículoestimulante, y hormona luteinizante, la melatonina modifica la secreción de la hormona del crecimiento, hormona adrenocorticotropa, hormona estimulante del tiroides así como hormona estimulante de los melanocitos. Adicionalmente, las hormonas de la hipófisis posterior están bajo la influencia de la melatonina. Otros ejemplos de sistemas endocrinos modulados por

melatonina lo constituyen, la liberación de insulina por la célula β , la síntesis de progesterona en las células del cuerpo luteo del ovario y las hormonas gatrointestinales (Reikin, 1983).

Durante años se ha sabido que la melatonina impide la replicación celular, y más recientemente se han definido sus propiedades oncostáticas. Especialmente, en relación con los tumores de mama con receptor estrogénico positivo, el cáncer de próstata, y los carcinomas de colon, la melatonina ha demostrado tener importantes acciones inhibitorias (Blask, 1984). En general, la melatonina parece tener un efecto inmunocompetente particularmente aparente en estados inmunodepresivos. La producción de anticuerpos en animales inmunizados con antígenos y tratados con melatonina es significativamente mayor que en animales a los que sólo se les administró el antígeno (Maestroni, Conti, Pierpaoli, 1989) Este efecto inmunocompetente parece estar mediado por péptidos opioides derivados de los linfocitos T "helper" así como por linfoquinas (Maestroni, 1993). Los inmuno-opioides inducidos por melatonina (MIIO) y las linfoquinas implican la existencia de sitios de unión o receptores de melatonina en células del sistema inmune. Por otro lado, algunas linfoquinas, γ -interferon y interleukina 2 así como las hormonas tiroideas modulan la síntesis de melatonina (Withyachumnarnkul y col., 1990).

En estudios recientes, se ha mostrado que la melatonina es un neutralizador muy eficiente del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), radical libre de elevada toxicidad y del radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), (Tan y col, 1993; Pieri y col, 1994). La capacidad neutralizadora de radicales libres de la melatonina es significativamente mayor que la del glutatión (Meister, 1992), conocido antioxidante. Además la melatonina estimula la glutatión peroxidasa (Barlow-Walden, 1995) que transforma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), precursor del $\cdot\text{OH}$, en agua (H_2O), oxidando el glutatión reducido. La melatonina tiene una eficiencia neutralizadora del radical peroxilo, radical generado durante la peroxidación de lípidos que produce destrucción de membranas biológicas, mayor que la vitamina E (Packer,

Introducción

1994). Concentraciones fisiológicas de melatonina inhiben la sintasa de óxido nítrico (Pozo y col., 1994) que genera ($\text{NO}\cdot$) que puede dar lugar a $\cdot\text{OH}$. Estudios *in vivo* han demostrado que la melatonina es realmente potente en proteger del daño inducido debido a la administración de carcinógenos (safrol) (Tan y col., 1994), radiaciones ionizantes (Vijayalaxmi, 1995) y tóxicos (endotoxina bacteriana LPS, paraquat) (Sewerynek y col., 1995, Reiter 1995) cuyo mecanismo de acción es debido, al menos en parte, a la inducción de radicales libres. Actualmente no se sabe si la capacidad antioxidante de la melatonina es puramente un efecto farmacológico o tiene relevancia a concentraciones fisiológicas, pero de cualquier forma puede tener elevado interés terapéutico.

1.3.7.1. Inhibición de la síntesis de AMPc mediada por receptores de melatonina

La respuesta funcional del receptor de melatonina a nivel bioquímico es la inhibición de la producción de AMPc. Se ha demostrado que la melatonina inhibe la acumulación de AMPc inducida por forskolina en la hipófisis posterior de ovino y hamster, probablemente, a través de una proteína G sensible a toxina pertussis (Carlson, Weaver y Reppert, 1989). En la hipófisis anterior de ratas neonatas la melatonina inhibe la producción de GMPc, así como AMPc, inducida por estimulación con hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH).

1.3.8. Localización del receptor de melatonina

Las técnicas autoradiográficas que emplean radioligandos de alta afinidad y especificidad por receptores de melatonina ($2\text{-}^{125}\text{I}$ melatonina) han permitido la localización regional de éstos. Las pocas y discretas áreas del cerebro, hipófisis y retina donde se han encontrados sitios de unión (Tabla II) sugieren que la hormona desempeña funciones específicas a nivel central.

Tabla II. Localización y función de receptores de melatonina de afinidad picomolar, en mamíferos (tomada de Krause y Dubocovich, 1990)

| Sitios de unión para 2-I ¹²⁵ melatonina | Especies | función celular |
|--|--|--------------------------|
| Hipófisis | | |
| Pars tuberalis | rata, hamster, | ↓ AMPc |
| adenohipófisis | oveja, ratón, ardilla rata neonatal | ↓ AMPc, ↓ GMPc |
| Retina | | |
| células amacrinas | conejo | ↓ liberación de dopamina |
| SNC | | |
| Hipotálamo | | |
| NSQ | humano, rata | no conocida |
| NPV | hamster, rata, ratón | |
| núcleo reuniens | hamster, ratón | no conocida |

Otras localizaciones:

área postrema (rata), plexo coroideo (rata), estría terminalis (ratón), núcleo de la estría medularis (hamster), núcleo hipotalámico dorsomedial (hamster), área hipotalámica anterior (ratón), núcleo talámico anteroventral (rata) y anteromedial (ratón), subiculum (rata), núcleo lateral de la habénula (hamster)



Introducción

Los receptores de melatonina localizados en el núcleo supraquiasmático (NSQ) (Reppert y col., 1988) y paraventricular (NPV) pueden estar implicados en la sincronización de los ritmos biológicos. Se ha mostrado que la melatonina inhibe la actividad eléctrica y metabólica en el NSQ (Cassone, 1990). Los receptores localizados en la *pars tuberalis*, eminencia media y *pars anterior* de la hipófisis mediarían los efectos neuroendocrinos de la melatonina, en particular los conocidos efectos gonadotróficos y tirotrófico (Tamarkin, Baird y Almeida, 1985; Morgan y col., 1989).

En la retina, se piensa que la activación de los receptores de melatonina, por la hormona sintetizada localmente, induciría la respuesta adaptativa a la oscuridad regulando la agregación de melanosomas en el epitelio pigmentado de la retina (Redburn y Mitchell, 1989). Por otro lado, la síntesis y liberación de dopamina en la retina, principal catecolamina en este tejido en la mayoría de los vertebrados, es activada por luz e inhibida por melatonina. A su vez, la biosíntesis de melatonina está regulada negativamente por dopamina. Como resultado de estas mútuas acciones inhibitorias, los ritmos de producción de melatonina y dopamina tienen fases opuestas. Así, la melatonina puede tener una función relevante en la retina mediante la inhibición de las células dopaminérgicas (Dubocovich, 1983). Los sitios de unión de melatonina en otras regiones continúa siendo un área de intensa investigación.

1.4. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

En el presente trabajo, los objetivos que se han propuesto han sido estudiar las conductancias iónicas activadas por NA y ACh en células pineales de rata, así como el tipo de receptores que median la respuesta eléctrica. Investigar el patrón de la señal de Ca^{2+} inducida por los agonistas adrenérgicos y, potencialmente, colinérgicos, así como

el posible significado funcional de las respuestas mediadas por ambos agonistas. Por último, se ha querido abordar el estudio de la secreción de indolaminas, y particularmente, identificar los productos de secreción indólicos así como el mecanismo de secreción de éstos.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. CULTIVO CELULAR

Los pinealocitos se obtuvieron mediante dispersión enzimática y mecánica de glándula pineal de rata Wistar, de un mes de vida, aproximadamente. Se utilizaron indistintamente ratas de ambos sexos.

2.1.1 Extracción de la glándula pineal de rata

2.1.1.1 Localización anatómica

La glándula pineal o epífisis cerebral en la rata es un pequeño órgano de color blanco rosado que en su desarrollo ha migrado en sentido dorsal para localizarse superficialmente bajo el cráneo, concretamente, a nivel del punto lambda de las coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata (Figura 12).

El punto lambda se define como el punto medio de la curva ideal que describe

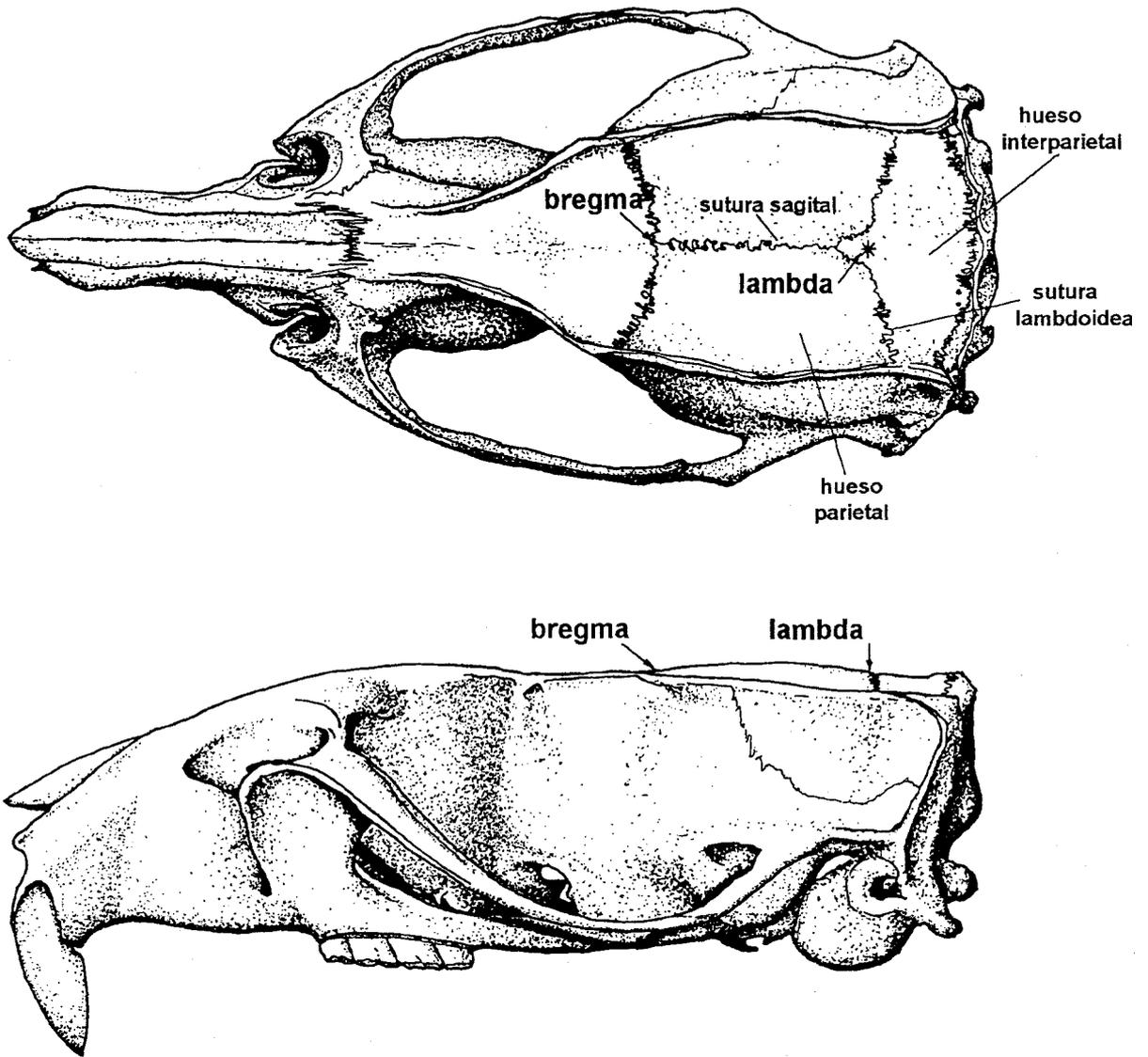


Figura 12. Vista dorsal y lateral de un craneo de rata adulta. En el panel superior e inferior de la figura se muestran la vista dorsal y lateral de un craneo de rata, respectivamente. La coordenada estereotáxica lambda se localiza en el punto medio de la curva ideal (ajuste de la curva real) que describe la sutura lambdoidea. (Tomada de "The rat brain in stereotaxic coordinates", G. Paxinos y C. Watson, Ed Academic Press, 1982)

la línea sinuosa de la unión del hueso interparietal con los huesos parietales del cráneo (sutura lambdoidea); aproximadamente, en la confluencia de la sutura sagital (entre los huesos parietales) con la lambdoidea.

La glándula pineal de rata está conectada con el resto del diencéfalo y tercer ventrículo por un pedúnculo o tallo (que contiene fibras nerviosas, vasos sanguíneos y tejido conectivo). La glándula tiene forma ovoide, mide ~ 1-2 mm de diámetro mayor y está envuelta por una capa de tejido conectivo o piamadre.

La glándula pineal de rata ocupa un espacio triangular *en cuña*, delimitado rostralmente por el ángulo que forman la corteza cerebral retrosplenial y estriada de cada hemisferio, al separarse del plano de simetría del cerebro. El límite dorsal de la ubicación de la glándula lo constituye el lóbulo 4 y 5 del cerebelo. El suelo sobre el que descansa la glándula pineal es la depresión existente entre los tubérculos cuadrigéminos superiores e inferiores (figura 5).

2.1.1.2. Proceder en la extracción de la glándula pineal

Se utilizaron 2-3 ratas por preparación. Con cada animal se procedió secuencialmente de la misma forma:

Se introdujo la rata en una campana de anestesia con triclorometano (Panreac). Una vez anestesiada, fue decapitada con guillotina (Lética, España). Tras sección sagital de la piel que recubría la calota craneana, se expuso ésta. Con una gubia se realizó una craneotomía resecaando el hueso interparietal y las porciones más dorsomediales de los huesos parietales.

Una vez disecada la duramadre, al ser la ubicación de la glándula muy superficial, ésta quedó bien expuesta. A continuación, la glándula pudo ser fácilmente resecaada tras la sección del pedúnculo pineal que la conecta al resto del diencéfalo.

Recién extraída la glándula, se depositó en una solución salina, sin calcio ni

Material y métodos

magnesio añadidos , a 4° C (ver *soluciones*).

2.1.2. Dispersión celular

Obtenidas 2-3 glándulas, bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-1B, Japón), utilizando iluminación fría (Intralux 4000, Volpi, Suiza) y con ayuda de pinzas finas, se resecaron los restos de tejido conectivo y vasos sanguíneos que rodeaban la glándula.

A continuación, se pasaron las glándulas varias veces por solución limpia y, finalmente, se depositaron en una solución de idéntica composición iónica pero con proteasa inespecífica añadida (proteasa XIV, Sigma) a una concentración de 0.5 mg/ml. Las glándulas se mantuvieron en un baño con agitación (Unitronic 320 OR, Selecta, España) termostatado a 36° C, durante 30-35 minutos para digestión enzimática del conectivo de las glándulas. Una vez terminado este tiempo, las glándulas se pasaron a medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado fue el Ham F10 (Flow) sin glutamina y con tampón bicarbonato. Como suplementos se utilizaron: penicilina (50 u.i./ml), estreptomina (50µg/ml), 10% v/v de suero bovino fetal y 1% v/v l-glutamina.

La dispersión y la siembra celular se realizó en condiciones de esterilidad: en campana de flujo laminar y utilizando material estéril de un sólo uso. Para la dispersión mecánica de las células se utilizaron pipetas pasteur de vidrio con puntas de diámetro progresivamente menor pulidas por calor. Mediante una suave aspiración-eyeción del medio de cultivo con tejido glandular ya digerido enzimáticamente, se obtuvo una suspensión celular de turbidez homogénea.

2.1.3. Siembra y mantenimiento del cultivo celular

La suspensión celular se depositó sobre los pequeños soportes de siembra celular previamente preparados, y contenidos en una placa de petri de poliestireno estéril. El cultivo celular se mantuvo en una cámara de incubación (Selecta) a 36 °C y

5% de CO₂, condiciones en las que permaneció hasta el momento del registro, de 1 a 5 días después de la dispersión.

2.1.3.1. Preparación de soportes y material para cultivo celular

Los soportes para la siembra celular se prepararon poco antes de iniciarse la extracción de las glándulas, como se detalla a continuación:

1.- Se cortaron cubreobjetos de vidrio (nº 1) en pequeños trozos rectangulares (~ 3 x 10 mm) con una punta de diamante.

2.- Estos trozos se depositaron en etanol durante unos quince minutos, para disolver posibles impurezas adheridas a su superficie.

3.- A continuación, se lavaron varias veces con agua desionizada y se secaron en la campana de flujo de aire laminar (Gelaire VB85, Gelman Instruments, Italia).

4.- Una vez secos, se flamearon en la llama de un mechero bunsen.

5.- Se depositaron en una solución de poli-L-lisina (sal hidrobromuro, P-1524, Sigma), 1 mg/ml, con tampón tris(hidroximetil)aminoetano, pH 8.5, (TRIZMA 8.5, T-5378, Sigma) a concentración de 19 mg/ml. Este compuesto, formado por distintos poliaminoácidos de alto peso molecular (> 300.000 D), forma una matriz que favorece la adhesión celular a la misma.

6.- Transcurridos unos 45-60 min, se lavaron los soportes primero con agua desionizada, luego con solución salina filtrada y tamponada (p.e., solución de dispersión celular, ver apartad *soluciones*) y de nuevo con agua desionizada.

7.- Se secaron y depositaron en una placa de petri de poliestireno, ya listos para la siembra celular.

Para tener material disponible para varios cultivos, se preparó además un lote de pipetas de vidrio pasteur a las que se les introdujo, en su extremo más ancho, un trozo de algodón (como filtro de aire) y también se preparó un lote de portafiltros

Material y métodos

(swinnex-25, Millipore, EE.UU.) a los que se les colocó un filtro de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore). Todo ello se introdujo en un autoclave (Microclave S-477, Selecta, España) para su esterilización, a 125° C y 1.2 atm. durante 45 minutos.

2.2 SOLUCIONES

Se prepararon con agua destilada por osmosis inversa (Milli-Ro 6 Plus, Millipore) y desionizada en resina de intercambio iónico (Milla-Q Plus, Millipore), con una resistividad de 18.2 M Ω cm. Todas las sales fueron suministradas por Sigma, Merck o Panreac.

Se prepararon soluciones concentradas con cada una de las sales, a las que se les midió la osmolalidad con un osmómetro de presión vapor (Weiscor, Utah, EE.UU.), y a partir de las cuales, se calculó la concentración real de soluto en cada disolución. Mezclando volúmenes calculados de estas soluciones se prepararon todas las demás. Las soluciones se almacenaron durante meses a 4 °C.

Todas las soluciones finales se ajustaron a un pH de 7.2/7.3, titulando mediante un pHmetro (MicropH 2002 Crison, Barcelona, España) con NaOH, KOH o CsOH, según el catión predominante en cada solución.

2.2.1. Soluciones empleadas en la preparación celular

La composición iónica de la solución empleada en el aislamiento de la glándula y en el tratamiento enzimático fue (en mM): 135 ClNa, 2.7 ClK y 10 HEPES. No se añadieron cationes divalentes para facilitar la dispersión celular (0 Ca²⁺-0 Mg²⁺), pH 7.35, osmolaridad 290 mOsm.

Tabla III. Soluciones de registro

| EXTERNAS | | | | | | | |
|--|------|-----|--------------------|--------------------|---------|---------------------|---------|
| | CINa | CIK | Cl ₂ Ca | Cl ₂ Mg | EGTA | HEPES | glucosa |
| control | 145 | 2.7 | 2.5 | 1 | | 10 | 10 |
| 0Ca ²⁺ | 145 | 2.7 | | 1 | | 10 | 10 |
| 0Ca ²⁺ -EGTA | 145 | 2.7 | | 1 | 1 | 10 | 10 |
| todo Na ⁺ | 145 | | | | 1 | 10 | 10 |
| INTERNAS | | | | | | | |
| corrientes iónicas | CICs | CIK | GluK | Cl ₂ Mg | EGTA-Ca | EGTA-K ₂ | HEPES |
| K ⁺ -0.1 μM Ca ²⁺ | | 150 | | 7 | 0.225 | 0.3 | 10 |
| K ⁺ -0.9 μM Ca ²⁺ | | 150 | | 7 | 1.8 | 0.2 | 10 |
| K ⁺ -0 Ca ²⁺ | | 150 | | 7 | | 10 | 10 |
| Cs ⁺ -0.1 μM Ca ²⁺ | 150 | | | 7 | 0.225 | 0.3 | 10 |
| Cs ⁺ -1.3 μM Ca ²⁺ | 150 | | | 7 | 2.7 | 0.3 | 10 |
| Nistatina | | 150 | | | 0.225 | 0.3 | 10 |
| 14 Cl | | | 125 | 7 | 1.8 | 0.2 | 10 |
| 32 Cl | | 18 | 118 | 7 | 0.225 | 0.3 | 10 |
| 46 Cl | | 32 | 118 | 7 | 0.225 | 0.3 | 10 |
| capacidad | | | | | | | |
| Cs ⁺ -2 μM Ca ²⁺ | 150 | | | 7 | 4.5 | 0.3 | 10 |
| Cs ⁺ -1 μM Ca ²⁺ | 150 | | | 7 | 2.225 | 0.3 | 10 |
| K ⁺ -1.6 μM Ca ²⁺ | | 150 | | | 2.2 | 0.2 | 10 |
| K ⁺ -0.9 μM Ca ²⁺ | | 150 | | | 1.8 | 0.2 | 10 |
| K ⁺ -0.1 μM Ca ²⁺ | | 150 | | | 0.35 | 0.225 | 10 |

2.2.2. Soluciones de registro

En la tabla III se muestran las soluciones externas (en la cámara de registro) e internas (intracelulares) empleadas (en mM).

La solución externa tuvo una osmolalidad de 10 a 30 mOsm mayor que la interna. Con frecuencia, la externa se suplementó con 10/20 mM de glucosa (Panreac). Como tampón amortiguador de los cambios de pH se utilizó HEPES en forma ácida para la solución interna y una mezcla de HEPES ácido y sódico para la externa. Teniendo en cuenta que el HEPES tiene un pK de 7.5 (25° C), la cantidad relativa de HEPES ácido y sódico necesaria para obtener el pH deseado se calculó a partir de la ecuación:

$$pH - pK + \log \frac{[HEPES - Na]}{[HEPES \text{ ácido}]} \quad (1)$$

2.2.2.1. Ajuste de la $[Ca^{2+}]$ en las soluciones

Las distintas concentraciones de calcio iónico utilizadas en soluciones internas se obtuvieron a partir de diferentes combinaciones de EGTA- K_2 y EGTA-Ca. El protocolo seguido evita errores derivados de posibles impurezas en el EGTA (Miller y Smith, 1984) permitiendo preparar soluciones de Ca^{2+} con gran exactitud (~99%) (Neher, 1989). El procedimiento seguido se detalla a continuación:

Se preparó una solución de EGTA, 200 mM, que se tituló con KOH hasta obtener un pH de 6.5. Parte de esta solución de EGTA libre se diluyó a 100 mM, trituyó a pH 7.2 y almacenó a -20 ° C. A la otra parte se le añadieron pequeñas cantidades de $ClCa_2$. Entre adición y adición de $ClCa_2$ se volvió a tritiar el pH a un valor de 6.5 con KOH. Inicialmente, se requirió la adición de dos moles de KOH por cada mol de $ClCa_2$ para restaurar el pH a 6.5. Cuando la cantidad de $ClCa_2$ añadida estuvo próxima a saturar el

EGTA, la cantidad de KOH requerida para ajustar el pH a 6.5 disminuyó rápidamente. El momento en el que un mol de KOH neutralizaba la modificación del pH inducida por un mol de ClCa_2 fue tomado como el punto de saturación del EGTA con Ca^{2+} . Subsecuentemente, la solución fue diluida a la mitad (100 mM), ajustada a un pH de 7.2 y almacenada a -20°C . La concentración de calcio de esta solución es igual a la concentración de EGTA con un margen de error $< 1\%$ (Neher, 1989). La concentración final de Ca^{2+} en la solución interna se calculó asumiendo una constante de disociación del EGTA-Ca de $0.15 \mu\text{M}$.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \frac{[\text{EGTA} - \text{Ca}]}{[\text{EGTA}]_T - [\text{EGTA} - \text{Ca}]} \quad (2)$$

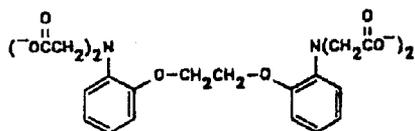
2.3. MICROFLUOROMETRÍA

Es una técnica óptica que permite cuantificar la emisión de fluorescencia de una muestra microscópica que ha sido marcada con una sustancia cuya fluorescencia es sensible a un parámetro de interés, tal como la $[\text{Ca}^{2+}]$, el pH, el potencial de membrana, etc. En el presente trabajo se han monitorizado los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante el indicador fluorescente fura-2.

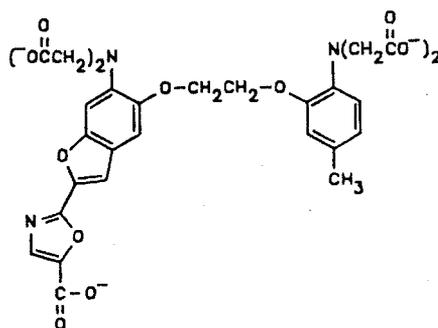
2.3.1. Indicador de calcio

El indicador fluorescente de calcio empleado fue fura -2 (Molecular Probes, EE.UU.) (Figura 13 B). Este fluoróforo fue desarrollado por el Dr Roger Tsien y sus colegas (Grynkiewicz, Poenie y Tsien, 1985) y procede de un quelante de calcio no

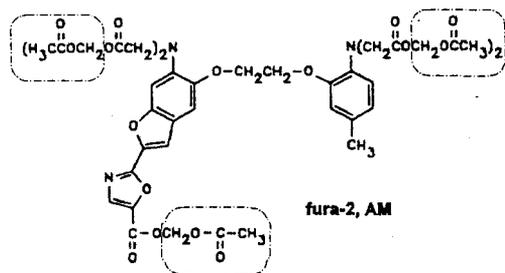
A



B



C



D

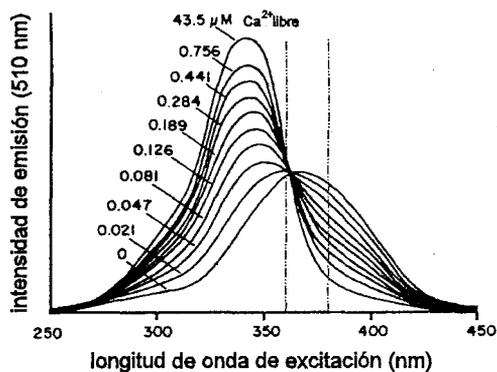


Figura 13. Quelantes e indicadores de Ca^{2+} **A.** Estructura química del BAPTA, 5 bis (aminofenoxi) etano N,N,N,N, tetraacetato, quelante de Ca^{2+} no fluorescente. **B.** Estructura química del fura-2, indicador de Ca^{2+} fluorescente derivado del BAPTA. **C.** La molécula de fura-2 unida covalentemente a cinco grupos ésteres acetoximetilos (rectángulos de líneas discontinuas) constituyen el fura-2, AM, forma permeante celular. **D.** Espectro de excitación del fura-2 a concentraciones crecientes de Ca^{2+} iónico. Las líneas discontinuas hacen referencia a las longitudes de onda de los filtros de excitación empleados (357 y 380 nm)

fluorescente, BAPTA (figura 13 A). La forma empleada en nuestros experimentos fue fura-2 AM (Figura 13 C), en la que la molécula de fura-2 está conjugada con grupos ésteres acetoxi metilos (ésteres AM). Las moléculas de fura-2 AM atraviesan pasivamente la membrana plasmática y una vez dentro de la célula son hidrolizadas por esterases intracelulares volviéndose no permeables a través de la bicapa lipídica.

El espectro de excitación de fura-2, *in vitro*, con concentraciones crecientes de calcio libre se muestra en la Figura 13 D. A una longitud de onda de excitación de 340 nm el fluoróforo fura-2 incrementa su emisión de fluorescencia cuando une Ca^{2+} . Por el contrario, la emisión de fluorescencia es inversamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]$ a 390 nm. La emisión es independiente de la concentración de Ca^{2+} a 360 nm, es el punto isobéptico del fura-2. La intensidad de emisión máxima, por tanto, se desplaza en el espectro de 370 nm a 340 nm cuando una solución libre de calcio se satura con Ca^{2+} . Este desplazamiento permite usar el método de la razón de fluorescencia, que hace la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]$ independiente de la concentración de fluoróforo, grosor celular, apagamiento del fluoróforo y pérdida la mismo.

2.3.2. Equipo de microfluorometría

Constó de (Figura 14):

- *microscopio invertido* (Zeiss, Axiovert 35) equipado con *epifluorescencia*, que utiliza un *lámpara de xenón* (XBO 75 W/2) como fuente de luz para excitación

- juego de *filtros* de excitación (Optisk Laboratories, Lyngby, Dinamarca), de emisión y espejo dicróico, además de un diafragma en la vía de excitación y otro en la de emisión

- *fotomultiplicador* (Luigs & Neumann, Alemania) donde se transduce la emisión de fluorescencia en señal eléctrica, con una fuente de alto voltaje , y que va montado con un adaptador en C al microscopio, lo que permite que toda la luz pase hacia el fototubo

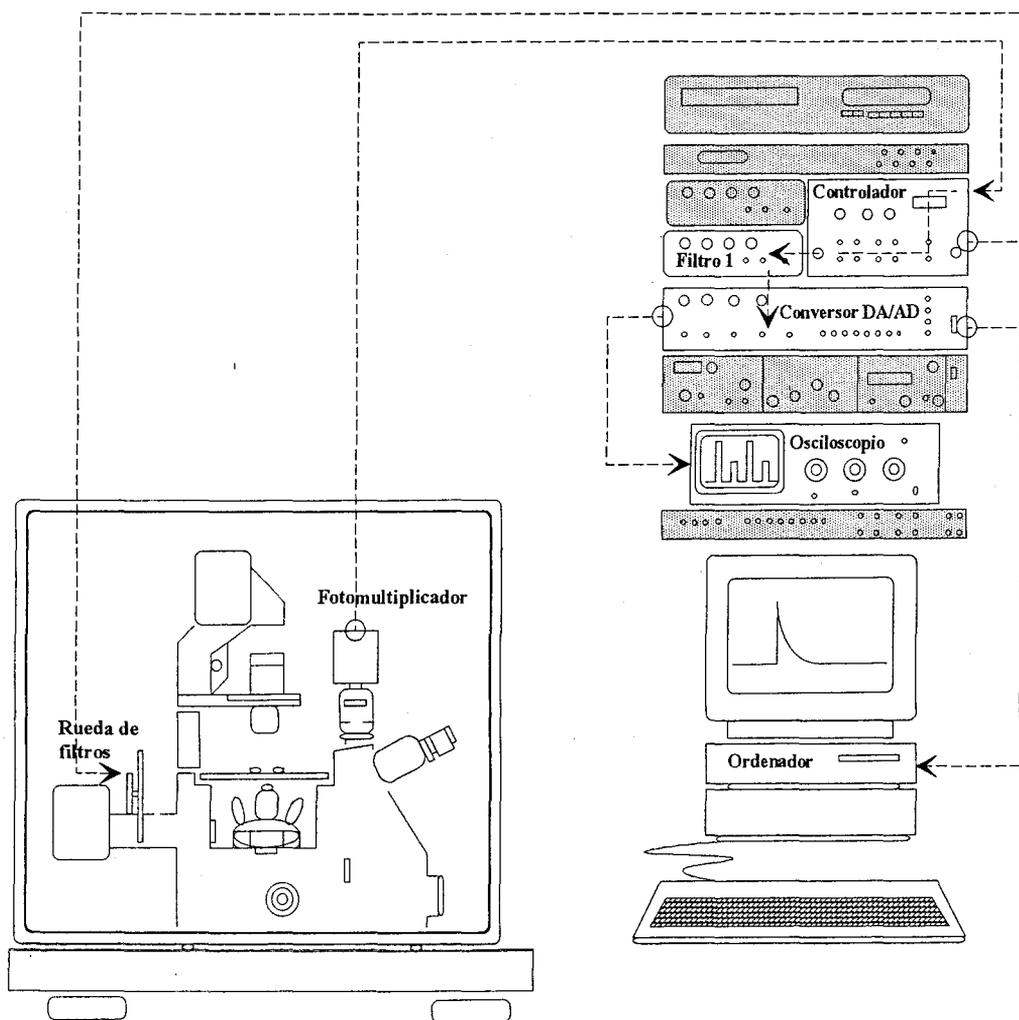


Figura 14. Esquema del dispositivo experimental de microfluorimetría para el registro de señales de calcio

o hacia el binocular, o parte hacia uno y hacia otro.

- unidad denominada *controlador* que alimenta el fotomultiplicador, procesa la señal procedente de éste y controla también el movimiento de una rueda donde van engastados dos de los filtros de excitación

- *interfase* (Capitola California, Indec, EE.UU) para la adquisición y conversión digital de la señal analógica.

- *ordenador personal* (PC/AT)

2.3.3. Filtros y otros componentes ópticos

Para monitorizar el incremento de fluorescencia que se produce a longitudes de onda cortas (p.e. 340 nm) cuando el fluoróforo une calcio, se necesitan ópticas de cuarzo, ya que la transmitancia de las ópticas estándar de vidrio cae notablemente por debajo de 360 nm. No obstante, el equipamiento con ópticas de cuarzo encarece considerablemente el sistema.

Una buena alternativa es utilizar la emisión obtenida a 390 nm como señal dependiente de la concentración de calcio, que es de similar calidad a la obtenida a 340 nm (el número de fotones que se obtienen de un molécula de fluoróforo antes de que se apague es similar). Sin embargo, dado que a 390 nm la fluorescencia del fluoróforo disminuye al unir calcio, se ha de tener en cuenta que a concentraciones muy altas de calcio la intensidad de la señal se hace tan pequeña que la relación señal ruido intrínsecamente empeora.

Puesto que nuestras mediciones estaban en un rango de concentración relativamente bajo ($< 1 \mu\text{M}$), la emisión resultante de la excitación a 390 nm se usó como señal dependiente de Ca^{2+} . La señal fluorescente necesaria para calcular la razón de fluorescencia se obtuvo a partir de la excitación a una longitud de onda de 357 nm.

En la Figura 15 se muestra un esquema de la localización de los filtros y otros

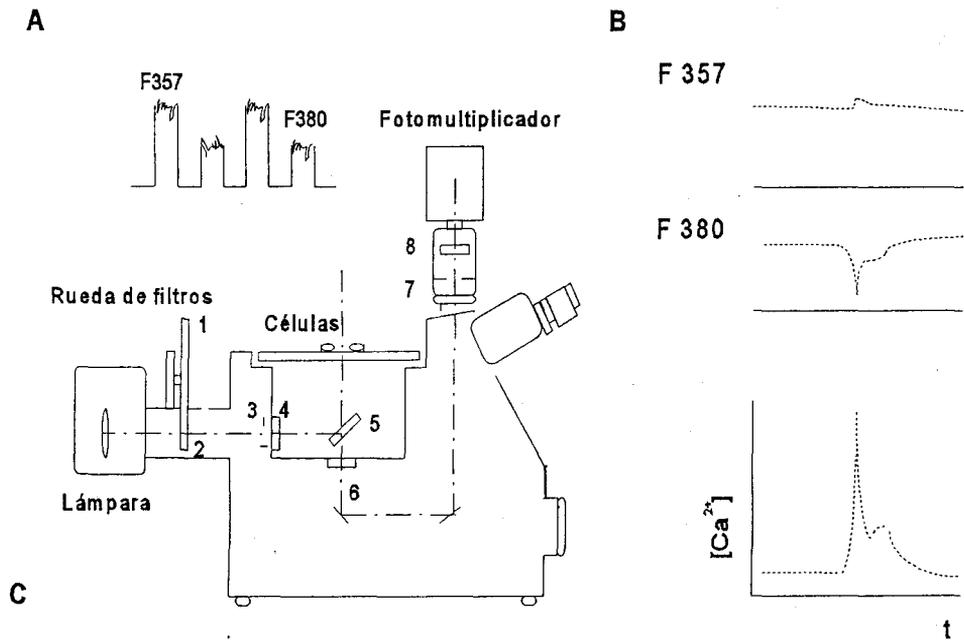


Figura 15. Esquema del dispositivo experimental para la medida de la fluorescencia **A.** Señal de fluorescencia emitida a dos longitudes de onda de excitación (alrededor de 357 y 380 nm) transducida en señal eléctrica en el fotomultiplicador. **B.** Promediado de la amplitud de cada pulso de voltaje en unidades arbitrarias (salida digital del convertidor A-D) representa la modificación de fluorescencia a 357 nm y 380 nm en función del tiempo tras un estímulo. La intensidad fluorescencia emitida a 357 nm y 380 nm es directa e inversamente proporcional, respectivamente a la $[Ca^{2+}]$. **C.** Vía de iluminación del sistema de epifluorescencia empleado. La rueda de filtros va situada entre la lámpara de xenón y el microscopio y contiene un filtro SWP 357 (1), el filtro BP 380/10 (2) va colocado en la rueda en una posición simétrica a la del filtro SWP 357. El filtro UG 1 va situado en la vía de excitación entre la rueda y la preparación (3). El portafiltras de epifluorescencia es un soporte cúbico que tiene un espejo dicróico (BSP 430), colocado con una inclinación de 45° (5). El filtro de emisión, LWP 470, se localiza en el cubo de filtros de epifluorescencia (6) y otro, SWP 540, a la entrada del fotomultiplicador (7). Se emplearon dos diafragmas, uno en la vía de excitación (4) y otro en la de emisión (8).

componentes ópticos en el sistema de epifluorescencia utilizado (parte C de la figura). La rueda de filtros, que va situada entre la lámpara de xenón y el microscopio, contiene un filtro SWP 357 (1), que es de paso bajo y complementa el filtro de paso alto que constituye la óptica del sistema, dejando un paso de banda que tiene una longitud de onda centrada alrededor de 357 nm. La máxima transmitancia de este paso de banda está en el rango de 0.1 (véase más adelante), menor que la del filtro BP 380/10 (2) que va colocado en la rueda en una posición diametralmente opuesta a la del filtro SPW 357, aunque esta diferencia de transmitancia no es significativa para causar distorsión de la intensidad de excitación en un espectro alrededor de 380 nm, para obtener intensidades de excitación más parecidas se ha empleado un filtro adicional (Schott UG1) que junto con el BP 380/10 proporcionan un paso de banda alrededor de 380 nm con una transmitancia máxima próxima a 0.1. El UG 1 va situado en la vía de excitación entre la rueda y la preparación (3). La luz que pasa a través del SWP 357 no se atenúa por la interposición del filtro UG1 (Figura 16).

El portafiltros de epifluorescencia es un soporte cúbico que tiene un espejo dicroico (LP 430), colocado con una inclinación de 45° (figura 15 C, 5), que refleja hacia la muestra de estudio todo haz de luz con una longitud de onda menor de 430 nm ($\lambda < 430$ nm) y por tanto, refleja las dos longitudes de onda de excitación, mientras que permite el paso a su través de todo haz con una longitud de onda mayor ($\lambda > 430$ nm) y por consiguiente, permite el paso de la fluorescencia de emisión hacia el fototubo o binocular.

Para reducir el ruido de fondo en el fotomultiplicador, se limitó la eficiencia de detección del fotomultiplicador a una banda con buena transmitancia para la luz emitida. Colocando un filtro de emisión, LWP 470, en el cubo de filtros de epifluorescencia (6) y otro, SWP 540, a la entrada del fotomultiplicador (7), se obtuvo un paso de banda con una buena transmitancia entre 470 nm y 540 nm. Este último filtro permitió además ver

transmitancia

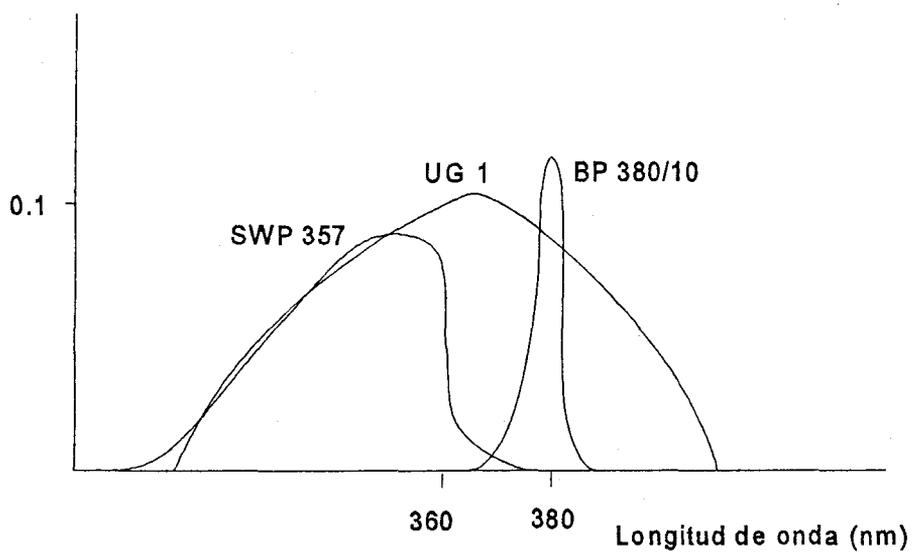


Figura 16. Espectro de transmitancia de los filtros de excitación

la preparación con luz roja sin que se afectara la medición.

El diafragma de emisión (8) permitió limitar el área de colección de la luz de fluorescencia a un área circular, dentro de la que se colocaba la célula a estudiar. Un diafragma en la vía de excitación (4) permitió también limitar el área del haz de luz de excitación.

Se usó un objetivo Plan-neofluar (Zeiss) x40, con una apertura numérica de 0.75.

2.3.4. El controlador

Los dos filtros insertados en la rueda alternativamente pasan a través del haz de luz de la lámpara, obteniéndose una secuencia de pulsos de luz. La circunferencia de la rueda contiene marcas estroboscópicas que, colocadas antes y después del paso del filtro, son detectadas por un fotosensor al reflectarse un haz de luz en las mismas. Con cada pulso la preparación emite una fluorescencia, que el fotomultiplicador transducirá en pulsos proporcionales de voltaje (Figura 15 A). La señal eléctrica obtenida entre las marcas es integrada, y la integral es mantenida a la salida del controlador hasta que pase de nuevo el mismo filtro. El instrumento consta de tres canales de salida de este tipo: uno para la señal de cada filtro y otro que mide la "señal de oscuridad" entre el paso de un filtro y otro.

Además, el controlador va provisto de un preamplificador entre la entrada de la señal procedente del fotomultiplicador y el circuito de integración, con ganancias seleccionables (1,2,5,10,20,50). La autofluorescencia del medio se canceló para cada una de las longitudes de onda mediante un potenciómetro en cada canal. Así mismo, se canceló el efecto de luz de la habitación o de la transiluminación roja sobre la medición, lo que permitió realizar los experimentos con luz y sin necesidad de un riguroso apantallamiento de la preparación.

Material y métodos

2.3.5. Sensibilidad de la medida a distintas longitudes de onda de excitación

En el método de la razón de fluorescencia que se utilizó para determinar la concentración intracelular de calcio (Grynkiewicz, 1985), la relación entre la razón de fluorescencia (R) y la concentración de Ca^{2+} (pCa) depende de la constante de disociación del fura (K_D) y de β (cociente de los valores de fluorescencia de la fracción de fura libre y unido a calcio con haz de excitación de mayor longitud onda). La dependencia de β hace que la elección del par de longitudes de onda sea un factor de importancia crítica.

$$[Ca^{2+}] = K_D \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \beta \quad (3)$$

$$R = R_{min} + (R_{max} - R_{min}) \frac{[Ca^{2+}]}{K_D \beta + [Ca^{2+}]} \quad (4)$$

La Figura 17 muestra la relación entre la razón de intensidades de fluorescencia y la concentración de Ca^{2+} para distintos pares de longitudes de onda. Los valores utilizados para el cálculo de las curvas se muestran a continuación:

| λ (nm) | R_{min} | R_{max} | β | K_D (nM) |
|----------------|-----------|-----------|---------|------------|
| 340/358 | 0.75 | 2.29 | 1 | 240 |
| 340/380 | 1.24 | 40.72 | 11.68 | 286 |
| 358/380 | 1.05 | 13.07 | 9.38 | 150 |

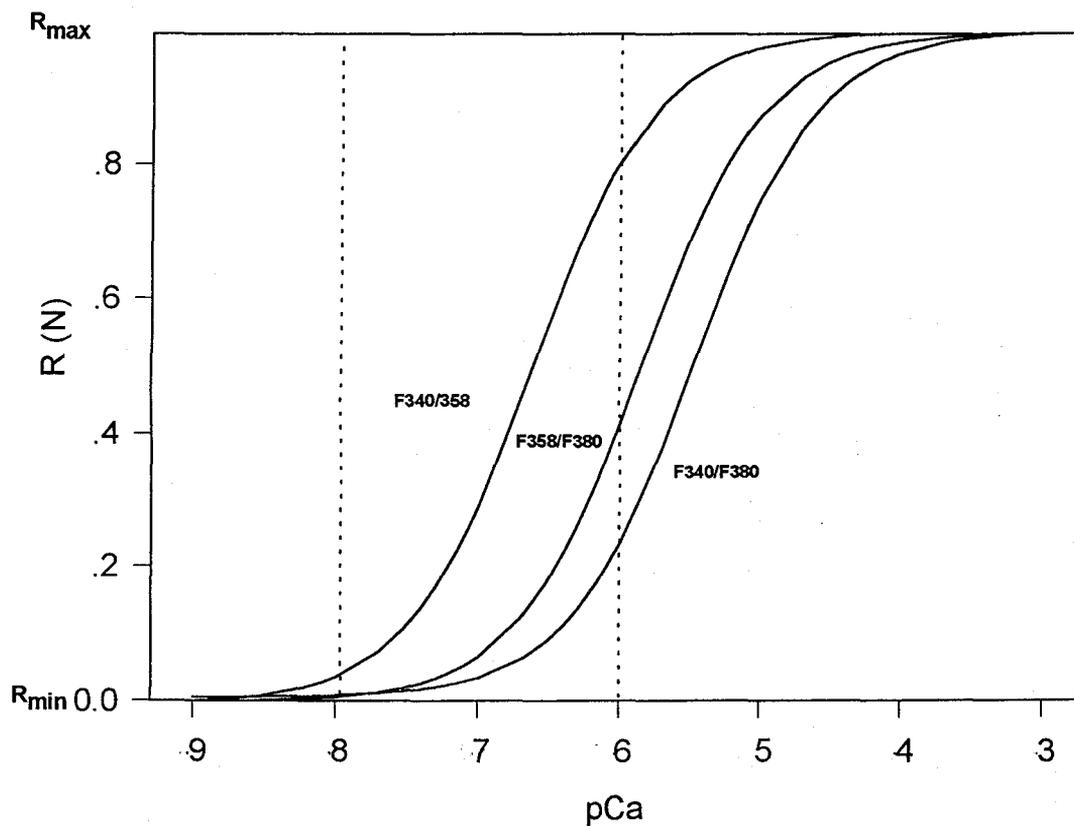


Figura 17. Relación razón de fluorescencia normalizada (R) y la concentración de calcio (pCa) para distintas longitudes de onda de excitación, calculadas según la ecuación 4. Los valores de los parámetros empleados para la obtención de las curvas con los pares 340/358 y 340/380 han sido tomados de Uto, Arai y Ogawa, 1991. Los del par 358/380 son nuestros valores de calibración.

Material y métodos

De los parámetros anteriores se ve que para el fura-2 el par de longitudes de onda 340/380 es el que mayor rango dinámico tiene (de 1.24 a 40.72), y el par 340/358 el que menos (de 0.75 a 2.29). Por el contrario, en la figura 17 se aprecia que el par 340/358 es el que muestra mayor linealidad en un rango de concentraciones de Ca^{2+} intracelular fisiológico (entre 10 nM y 1 μM) mientras que con el par 340/380 la razón de fluorescencia muestra una débil dependencia de la concentración de Ca^{2+} en este rango. La razón de fluorescencia a 358/380 tiene un rango dinámico (de 1.05 a 13.07) y en rangos fisiológicos, una dependencia del pCa intermedios. En nuestros experimentos, hemos utilizado el par de longitudes de onda 357/380 ya que presentan características adecuadas para la medición y, además, no es necesario utilizar ópticas de cuarzo.

2.3.6. Procedimientos de calibración

En el método de la razón de fluorescencia, el cociente de intensidades de fluorescencia a dos longitudes de onda (F^{360}/F^{380}) o razón de fluorescencia es adimensional y tiene que ser calibrado para que exprese concentraciones de Ca^{2+} . Las constantes de calibración son R_{min} , R_{max} y R (razón de fluorescencia en ausencia de Ca^{2+} a concentración saturante de Ca^{2+} , y a una concentración intermedia conocida, respectivamente) y β (razón de fluorescencia del fura-2 libre y unido a Ca^{2+} a una excitación de 380 nM, $F_{min}^{380}/F_{max}^{380}$). Estas constantes de calibración tienen que ser determinadas experimentalmente sobre un sistema de microfluorimetría dado, ya que están influenciadas por todos los componentes (la lámpara, los filtros, el fotomultiplicador, etc.). El procedimiento que utilizamos para obtener estas constantes fue la calibración *in vitro* empleando soluciones con concentraciones de Ca^{2+} conocidas y cuya composición (en mM) se muestra en la tabla IV:

Tabla IV: soluciones de calibración

| | ClK | Cl ₂ Ca | EGTA-Ca | EGTA-K ₂ | HEPES |
|----------------------------|-----|--------------------|---------|---------------------|-------|
| Ca ²⁺ saturante | 145 | 10 | | | 10 |
| Ca ²⁺ 300 nM | 145 | | 6.6 | 3.3 | 10 |
| 0Ca ²⁺ nominal | 145 | | | 10 | 10 |

En todos los casos el pH se ajustó cuidadosamente a 7.2. Un ejemplo de los valores obtenidos en nuestro dispositivo experimental es como sigue:

$$R_{min} = 1.05$$

$$R = 3.16$$

$$R_{max} = 13.07$$

$$\beta = 9.38$$

El valor de K_D para el fura-2 se calculó a partir del valor R obtenido en la solución con 300 nM Ca²⁺, mediante la aplicación de la ecuación x. Se asumió que la K_D para el EGTA a pH 7.2 es 150 nM. El producto $K_D\beta$ se denomina constante de disociación efectiva del calcio (K_{ef}) y fue 1407 nM.

Para la calibración *in vitro*, se empleó fura-2, pentapotasio (Molecular Probes, EE.UU.), concentración final 1-10 μ M.

2.3.7. Proceder experimental

2.3.7.1. Preparación del fura-2 AM

Se disolvió 1 mg de fura-2 AM en 1 ml de acetona. Esta disolución se repartió en 20 viales conteniendo 50 μ l de colorante cada uno y, posteriormente, se introdujeron en una cámara de vacío para evaporar la acetona. Las alícuotas así preparadas se

Material y métodos

conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para disolver en solución acuosa el fura-2 AM fue necesario hacer una previa disolución en DMSO (dimetilsulfoxido) ($10\text{ }\mu\text{l}$) para, después diluir el colorante hasta una concentración final de $2\text{ }\mu\text{M}$ (DMSO 0.05%).

2.3.7.2. Incubación y registro

De diez a cincuenta minutos antes de cada experimento, las células fueron incubadas con $2\text{ }\mu\text{M}$ de fura-2 AM a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, subsecuentemente, lavadas en solución libre de fura-2 por un tiempo mínimo de diez minutos.

Para cada cubre de vidrio con células cargadas con fura -2 , se compensó en el controlador el efecto sobre el sistema de fluorescencia de la iluminación ambiental, así como la autofluorescencia del cubreobjetos de la preparación en el baño, a las dos longitudes de onda de excitación.

Las soluciones control y test se aplicaron continuamente (Figura 18). Las barras marcadas en las figuras indican el momento en el que las soluciones se cambiaban (tiempo muerto 2-5 s). La composición de la solución usada fue (en mM): 145 ClNa, 2.7 ClK, 2.5 Cl_2Ca , 1 Cl_2Mg y 10 HEPES; glucosa 10-20, tamponada a un pH de 7.25-7.35 con NaOH. El ClCa_2 fue omitido en algunos casos, lo que se denotó como 0 Ca^{2+} . Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ($20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.3.8. Adquisición y análisis

En medidas de calcio con fura-2 se empleó un programa en lenguaje C desarrollado por el Prof. Ureña para la adquisición de las señales, cálculo de la concentración de calcio libre y representación gráfica de éstas durante la medición. La concentración de Ca^{2+} , se calculó cada 0.6 s a partir del promedio de los valores muestreados registrados durante este intervalo, para cada longitud de onda. La rueda giró entre 4-5 ciclos/s

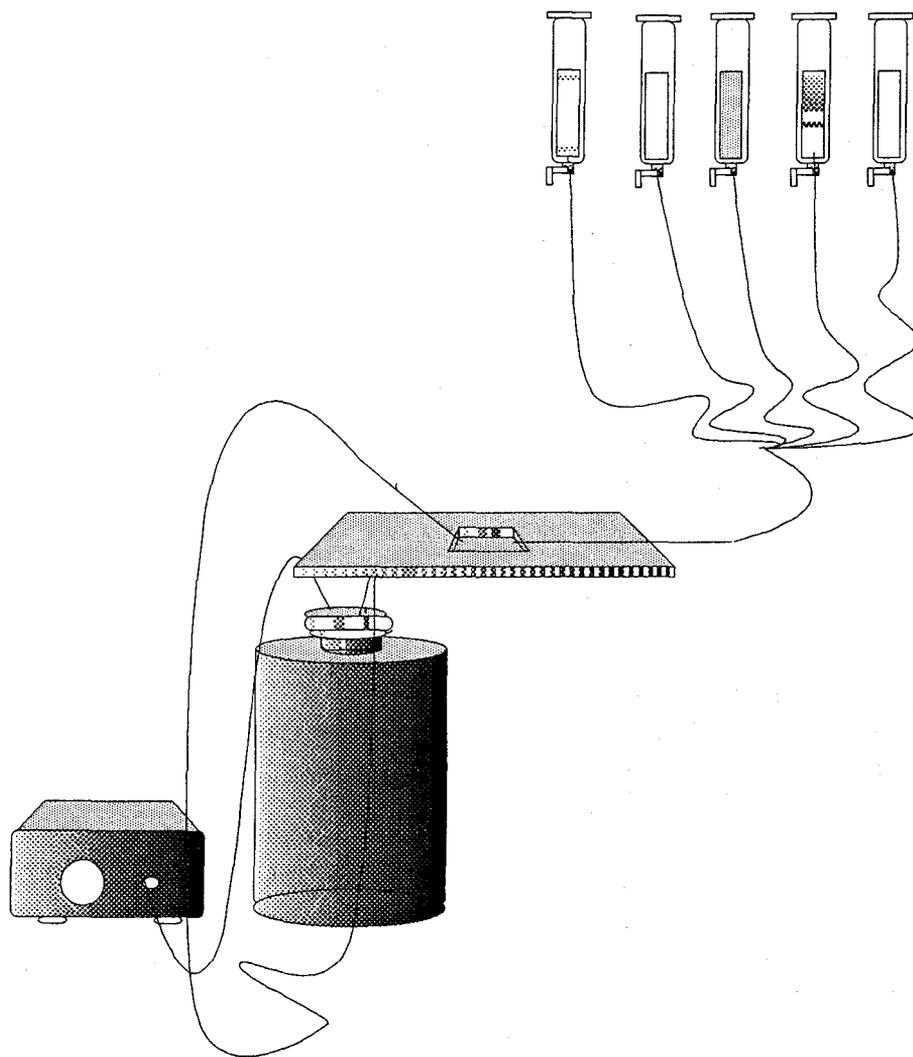


Figura 18. Sistema de perfusión empleado en microfluorometría. Las soluciones control o test fueron continuamente aplicadas por presión hidrostática. El sistema de drenaje por succión a un recipiente donde se practicó vacío con una bomba de aspiración.

2.4. REGISTRO DE CORRIENTES IÓNICAS

Se empleó la técnica de "patch-clamp" (Hamill y col, 1981) para el registro de corrientes a través de canales individuales en microáreas de membrana, o bien, para el registro de corrientes macroscópicas a través de toda la membrana celular. Así mismo, se utilizó en la medida del potencial de membrana y en la monitorización de los cambios de la capacidad eléctrica de la célula.

2.4.1. Equipo de "patch-clamp"

Nuestro equipo de "patch-clamp" constaba de (Figura 19):

- *mesa antivibratoria* (Micro-g, TMC, EE.UU.) en la que se instaló dos torretas metálicas verticales solidarias a la misma, colocadas a ambos lados del microscopio. La torreta derecha sustentaba una platina sobre la que se colocaba la preparación celular, con movimiento en el plano horizontal mediante micromanipuladores (Micro-control, Francia). La misma torreta también sustentaba el sistema de sujeción y micromanipulación de la micropipeta de "patch clamp" y del electrodo de voltametría (véase más adelante). Este micromanipulador permitía el movimiento del microelectrodo en las tres direcciones del espacio, siendo el movimiento vertical motorizado y sujeto a control remoto (MDC-3 remote, Klinger Scientific, EE.UU.). La torreta izquierda sustentaba otro micromanipulador, también con movimiento en los tres ejes, para la colocación de una micropipeta de aplicación de drogas.

- *microscopio invertido* (Axiovert 35, Zeiss, Alemania),

- *jaula de Faraday*,

- *amplificador de "patch clamp"* (EPC 7, List Electronics, Alemania),

- *ordenador* conectado con una *interfase* para la conversión analógico-digital y

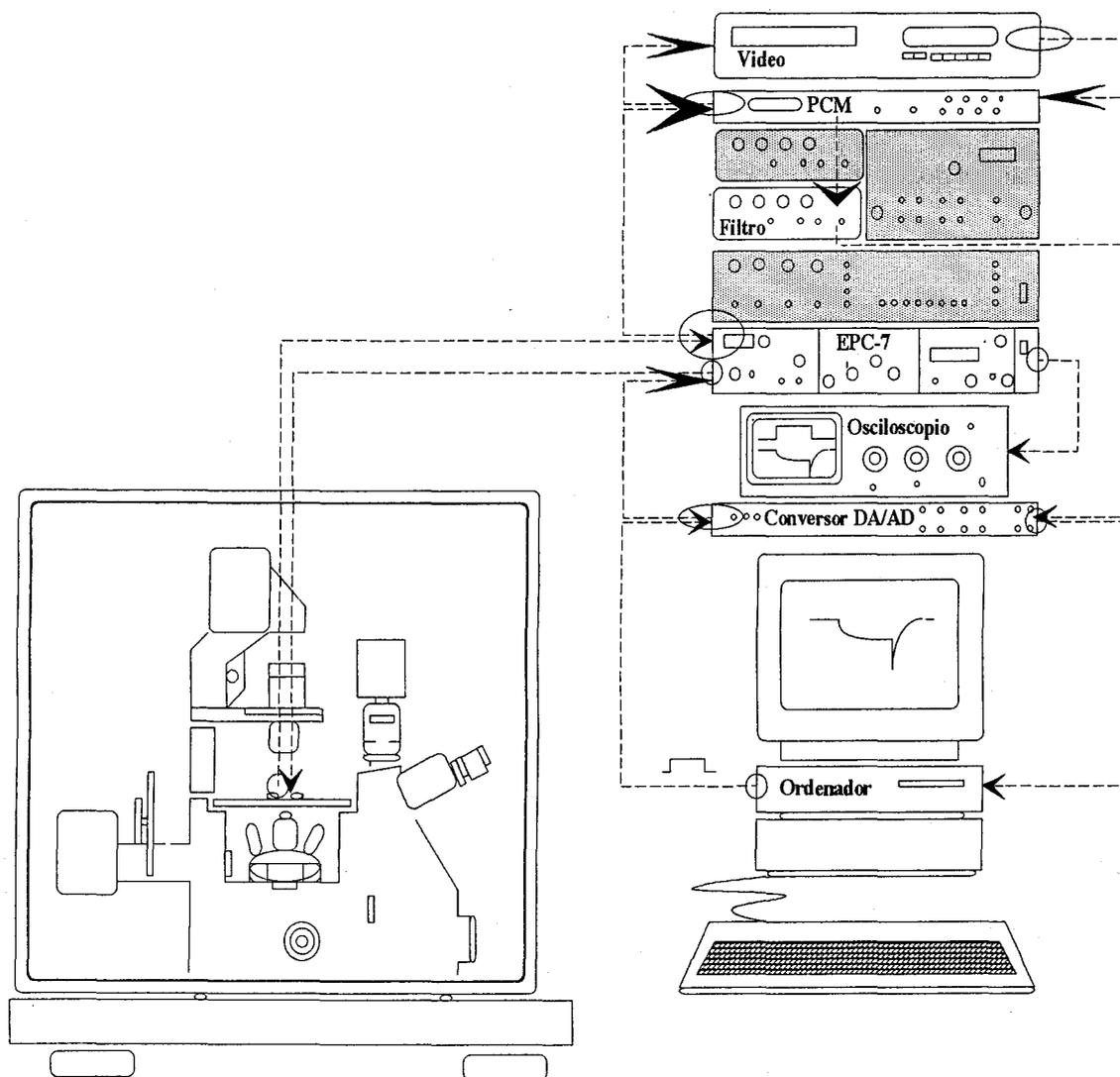


Figura 19. Esquema del dispositivo experimental para el registro de las corrientes iónicas de membrana, del potencial de membrana y señales voltamétricas o amperométricas

Material y métodos

digital-analógica. En los experimentos de corrientes iónicas y medidas de potencial de membrana se utilizó un ordenador Atari (Mega4-Megafile30, Atari, EE.UU.) con una interfase Instrutech (ITC-16, Instrutech Corp., EE.UU.). En los experimentos de capacidad se empleó un ordenador personal PC/AT (Fountain, EE.UU.) con una interfase Indec (Capitola California, Indec, EE.UU.).

- *osciloscopio* de 50 MHz (Tektronic 2225, Holanda),

- *tarjeta PCM* -modulación por codificación de pulsos (VR-10A CRC, Instrutech Corp) para almacenamiento de la información en

- *reproductor de video VHS* (VS-F12, Akai, Japón),

- *filtro Bessel de 8 polos* (Frequency Devices 902, EE.UU.) con una frecuencia de corte seleccionable entre 0.1 y 10000 Hz, para tratamiento analógico de la señal, y

- *sistema de imagen* para visualizar los cambios de morfología de la célula bajo estudio, integrado por una cámara CCD de video (Sony, Japón) con su controlador y un monitor de video (Trinitron, Sony).

2.4.2. Microelectrodos de registro

Se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (Kimax-51, 34502, EE.UU.), que tiene una baja conductividad dieléctrica, incluso para altas frecuencias, y por tanto, un bajo nivel de ruido.

Mediante un estirado por calor en dos fases, se obtuvieron pipetas con una resistencia reproducible entre uno y diez megaohmios ($1 < R_p < 10 \text{ M}\Omega$). Para este propósito, se empleó un estirador comercial con un solenoide alimentado por una fuente de corriente (L/M-3P-A, List-Medical, Alemania).

2.4.3. Registro de corrientes a través de canales iónicos individuales

Fueron registradas usando las variantes de parche *in situ* y parche escindido de

la técnica de "patch-clamp". Se emplearon micropipetas con una resistencia (R_p) entre 4 y 8 M Ω . Como electrodo indiferente, un hilo de plata clorurado (Ag-ClAg) en contacto con la solución del baño a través de un puente de agar.

La resistencia del electrodo se calculó a partir de la corriente (I) que fluía entre los dos electrodos al aplicar una diferencia de potencial (V) conocida entre ambos.

$$R_p = \frac{V}{I} \quad (5)$$

Después de introducir la micropipeta en el baño se canceló el potencial de unión del electrodo con la solución del baño. La aproximación de la micropipeta a la membrana celular aumentó R_p , y aún más, tras la aplicación suave de presión negativa al interior de la pipeta mediante succión, hasta alcanzar súbitamente valores de gigaohmios. El sellado de la punta de la micropipeta a la célula, aisló química y eléctricamente un parche de membrana del resto. Este gigasello permitió el registro de corriente de uno o varios canales individuales ubicados en el parche. En esta configuración se usó una resistencia de retroalimentación de 50 G Ω en el conversor corriente-voltaje (I/V) del amplificador (Figura 20) para monitorizar corrientes a través de canales únicos con una resolución de 50 mV/pA (ganancia 1). Esta es la modalidad de parche *in situ* de la técnica de "patch-clamp".

Además de esta modalidad se empleó la de parche escindido: traccionando de la micropipeta verticalmente, se escindió el parche de membrana del resto de la célula. Cuando la tracción se realizó desde la modalidad de parche *in situ*, quedó la cara interna de la membrana bañada por la solución extracelular. Haciéndolo desde la modalidad de célula completa (ver apartado siguiente) se obtuvo un parche escindido con la cara externa de la membrana hacia el baño.

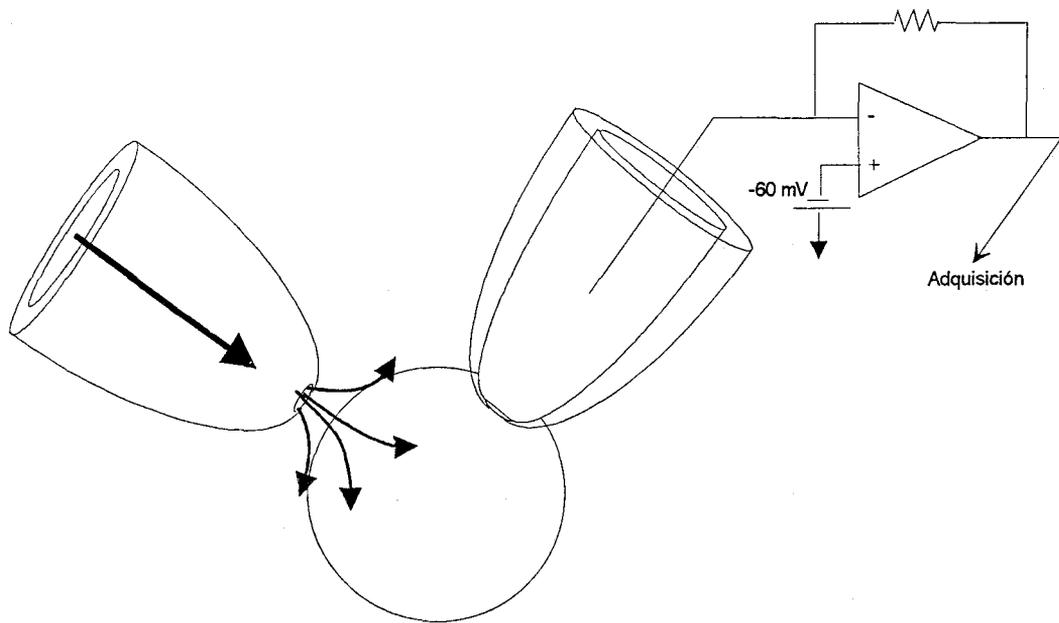


Figura 20. Aplicación de agonistas con una pipeta y registro con otra conectada al convertidor corriente-voltaje del amplificador de "patch-clamp"

2.4.4. Registros de corrientes iónicas en célula completa

Habitualmente se utilizaron pipetas con una resistencia entre 1-4 M Ω (R_p), menor que la empleada en registros de canales iónicos individuales. Una vez hecho el sello, como se describió previamente, se aplicó un pulso suave y mantenido de succión para eliminar la membrana bajo la punta de la micropipeta y acceder eléctricamente al interior de la célula. La apertura del parche de membrana se hizo evidente al aumentar el transiente capacitativo de la corriente desde valores menores de 1 pF (capacidad de la micropipeta y microárea de membrana sellada) hasta varios pF (de la capacidad de la membrana celular completa). En ésta modalidad de célula completa, la solución intracelular se intercambió con la solución electrolítica de la pipeta, con lo que se tuvo control sobre la composición iónica del medio intracelular, y se pudo aplicar drogas dentro de la célula.

Para el registro de corrientes macroscópicas la resistencia de retroalimentación del convertidor I/V que se seleccionó, usualmente, fue de 500 M Ω (0.5 mV/pA, ganancia 1), aunque eventualmente para corrientes de pequeña amplitud (< 200 pA) se usó la de 50 G Ω .

Los transientes capacitativos obtenidos en modo pulso se anularon mediante el circuito de cancelación de capacidad (un potenciómetro para cancelación de la capacidad de la pipeta y otro para cancelación de la capacidad de la membrana celular). Los valores de capacidad celular típicamente obtenidos oscilaban entre 5 -10 pF, mientras que la resistencia de acceso lo hacían entre 4-10 M Ω (conductancia: 0.25-0.10 μ S). No se utilizó compensación de la resistencia en serie. La señal se filtró en el amplificador de " patch-clamp" a 3 ó 10 KHz.

2.4.5. Aplicación de drogas

La aplicación de drogas se realizó mediante micropipetas, similares a las de

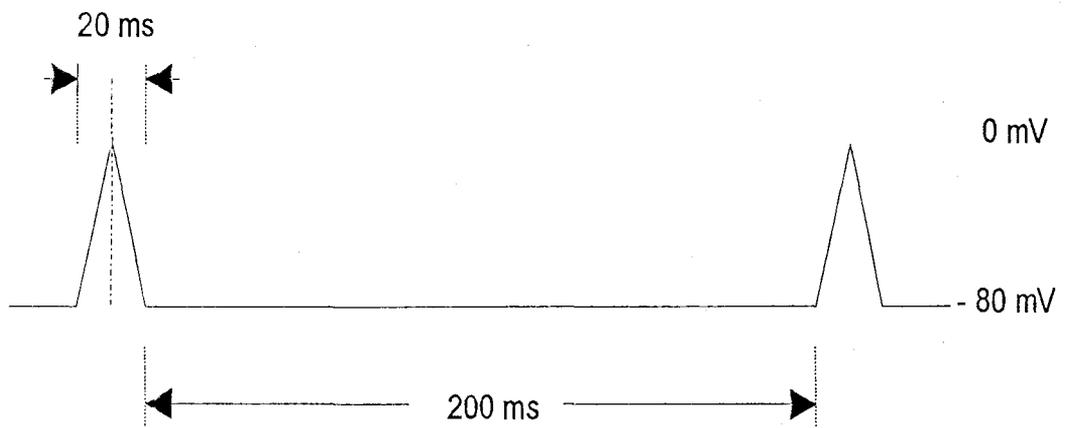


Figura 21. Ejemplo de protocolo de rampas empleado cuando se quiso monitorizar el registro de corrientes iónicas activadas por ligando a dos potenciales diferentes ($E_c = 0 \text{ mV}$ y $E_k = -80 \text{ mV}$).

registro (figura 20), conteniendo la solución test y colocadas a 1-2 μm de la célula, a las que se aplicaba presión positiva en el momento que indican las barras en los registros. En los periodos entre aplicaciones, la pipeta estuvo sometida a ligera presión negativa para evitar cualquier fuga de droga.

2.4.6. Adquisición y análisis

La adquisición de los registros de corrientes iónicas se realizó con el programa "Acquire", escrito por H Asfolter (Instrutech). Este programa permite adquirir, mostrar en monitor y almacenar datos (a través de un convertidor analógico-digital) mientras envía un estímulo (mediante un convertidor digital-analógico) en modo de pulso cuadrado, de rampa o continuo. Con este programa se generaron macros para aplicar distintas secuencias de pulsos con mayor rapidez y comodidad. La frecuencia de muestreo se seleccionó entre 10-100 μs .

En modo de pulso se empleó el protocolo P/4. En este protocolo cada secuencia de pulsos es seguida por una serie de cuatro copias de esta secuencia, divididas por un factor de cuatro, y fijadas a un potencial de membrana lo suficientemente negativo como para que no se activen conductancias dependientes de voltaje. Las respuestas de estos pulsos son sumadas y almacenadas con la respuesta del pulso principal, y son usados para la sustracción de los componentes lineales (capacitativos y resistivos).

Para el registro de corrientes activadas por ligando se aplicaron rampas de voltaje con el objeto de monitorizar la corriente a dos potenciales diferentes (p.e., a $E_K = -80 \text{ mV}$ y $E_{Cl} = 0 \text{ mV}$, Figura 21). También se usó en registros de canal único para confeccionar curvas corriente voltaje y determinar potenciales de inversión de corriente.

El modo continuo se empleó para el registro de corrientes iónicas totales activadas por ligando y corrientes unitarias a través de canales iónicos individuales a un potencial de membrana.

Material y métodos

Otro programa, "Review" (Instrutech), se utilizó para el análisis de corrientes totales activadas por voltaje en modo pulso (ajuste exponencial de las corrientes de cola, confección de curvas corriente-voltaje, etc).

En registros de canal único, la adquisición se hizo a una frecuencia de muestreo entre 10 y 100 KHz. El filtro del amplificador de "patch-clamp" se seleccionó a una frecuencia de corte de 3 KHz (filtro Bessel de 3 polos) y la señal se almacenó en cinta de video tras ser procesada digitalmente por la tarjeta de PCM, así filtrada. A veces, para evidenciar canales de pequeña conductancia, se filtró a posteriori aún más la señal, a 1 ó 2 KHz.

Para el análisis de corrientes unitarias se utilizó el programa TAC comercializado por Instrutech y descendiente del programa THAC (Thereshold Analysis of Continuos single channel record, descrito en Single Channel Recording, Sigworth, 1983). Permitió filtrar digitalmente la corriente, construir histogramas de duración y amplitud, y el ajuste de los mismos a distintas distribuciones.

2.5. REGISTROS POTENCIAL DE MEMBRANA

2.5.1. Perforación con nistatina

En los registros de fijación de corriente se utilizó la modalidad de parche perforado con nistatina, con objeto de evitar la completa diálisis del medio intracelular (Horn y Marty, 1988; Korn y Horn, 1989). Así mismo, también se utilizó en algunos registros de fijación de voltaje.

Toda la manipulación de la nistatina (Sigma) se realizó preservándola de la luz, ya que es fotosensible. Se preparó una solución de 5 mg nistatina en 20 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). A un volumen de 1 ml de solución interna en un

ependorf introducido en un baño de ultrasonidos a un nivel de inmersión en el que la solución interna tenía aspecto de agua hirviendo, se le añadió 1 μ l de solución de nistatina en DMSO para conseguir una concentración final 250 μ g/ml de nistatina y 1 % de DMSO y se mantuvo sonicando durante 1 ó 2 minutos hasta su completa disolución. Esta solución se repartió en alícuotas (100-200 μ l por ependorf) las cuales se preservaron de la luz y se almacenaron a -20 °C, empleándose en el término de dos semanas, al cabo de las cuales fueron desechadas. La solución de nistatina en DMSO se mantuvo también preservada de la luz y almacenadas a -20° C, hasta un máximo de un mes.

2.5.2. Registro del potencial de membrana en fijación de corriente

Descongelada una alícuota de solución interna con nistatina, se mantuvo en frío (4 °C) y en oscuridad por un período máximo de dos horas, al cabo de las cuales se desechó. La punta de la micropipeta se llenó por capilaridad, sumergiéndola en solución interna libre de nistatina. A continuación, se rellenó por detrás con la solución con nistatina, y se procedió rápidamente a realizar el sello de membrana, para evitar que la nistatina difundiera a la célula antes de haberlo conseguido, e impidiera su consecución.

Una vez hecho el sello se esperó pocos minutos hasta que la resistencia en serie fuera < 30 M Ω , momento en el que se empezó a registrar. A veces la perforación fue tan rápida y completa que parecía tratarse de una modalidad de célula completa tradicional. No obstante, cuando la nistatina difundía al interior de la célula, ésta se perforaba, apareciendo una importante corriente de fuga. Por tanto, mientras la resistencia de la membrana se mantuvo alta se consideró que se trataba de un parche perforado con nistatina en vez de la configuración clásica de célula completa.

Estando ya en la modalidad de parche perforado con nistatina de la técnica de "patch-clamp", se seleccionó en el amplificador la configuración de fijación de corriente.

Material y métodos

Así, el potencial de membrana se pudo monitorizar tomando como salida la de voltaje del amplificador, simultáneamente se podía leer el valor, en mV, del potencial en los dígitos de la pantalla de cristal líquido del amplificador.

Para inyectar corriente a la célula se seleccionó la opción de "fijación de corriente + corriente impuesta", y se aplicó en el terminal de entrada de estímulos un potencial con una ganancia de 1mV/pA. Además, se pudo inyectar corriente con el potenciómetro de potencial del amplificador, a este mismo factor conversión de 1 mV/pA.

2.6 REGISTRO DE LA CAPACIDAD ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA

La corriente total a través de un circuito RC en paralelo es la resultante de la suma algebraica de la corriente resistiva (a) y capacitativa (b), estando 90° fuera de fase una con respecto a otra. Esto permite que la corriente total resultante (I) pueda ser representada como el vector suma de dos vectores ortogonales (a y b), o que en el plano complejo el vector I quede definido por dos parámetros: un módulo o magnitud ($|I|$), y un argumento o ángulo de fase (α) con respecto al eje real (Figura 22 B).

2.6.1. Detección de fase

Para separar la corriente capacitativa de la corriente total (capacitativa y resistiva) que fluye a través de la membrana de una célula sometida a fijación de voltaje mediante la técnica de patch-clamp, se empleó el método de la *detección de fase* con un detector digital (Joshi y Fernández, 1988).

El detector de fase operó multiplicando la corriente total, I, por una función seno, por un lado, $\text{sen}(\omega t)$, y por una función coseno, por otro, $\text{cos}(\omega t)$. El producto del componente resistivo, $V/R \text{sen}(\omega t)$, por la función $\text{sen}(\omega t)$ es nulo, quedando sólo el

componente capacitativo de la corriente. Similarmente, cuando se multiplicó la corriente capacitativa, $C \cos(\omega t)$, por la función $\cos(\omega t)$, el componente capacitativo se anuló, aislando así la corriente resistiva. Así es como el detector de fase descompuso la corriente total en dos ondas, una proporcional al componente real o resistivo, $I \cos(\omega t)$, y otra al imaginario o capacitativo, $I \sin(\omega t)$ de la corriente (figura 22 C).

2.6.1.1. Simulación de la medida de la capacidad eléctrica con el método de la detección de fase

En la figura 22 se ilustra una simulación de la medición, mediante el método de detección de fase, de la corriente capacitativa de una célula sometida a fijación de voltaje, con la técnica de "patch-clamp".

Se consideró un circuito eléctrico equivalente de membrana cuyos valores de capacidad de membrana (C_m), de resistencia de membrana (R_m) y de resistencia de acceso en serie (R_s) fueron de 5.6 pF, 1GΩ, y 5 MΩ, respectivamente. A este circuito se le impuso una senoide de voltaje (V) de 27 mV de amplitud (54 mV de pico a pico) y 833 Hz de frecuencia. La corriente total resultante era una corriente sinusoidal I de la misma frecuencia, y 838 pA de amplitud, desfasada de V un ángulo α de 79.7° (Figura 22 A).

Las respectivas integrales de estas ondas producto dieron dos valores: el primero, a , proporcional a la admitancia real y el segundo, b , a la imaginaria, y a partir de las cuales se pudo calcular α , de tal modo proyección sobre el eje real e imaginario informara sobre el componente resistivo y capacitativo de la corriente, respectivamente (Figura 22 D).

$$\alpha = \arctan \frac{\int I \cos(\omega t)}{\int I \sin(\omega t)} \quad (6)$$

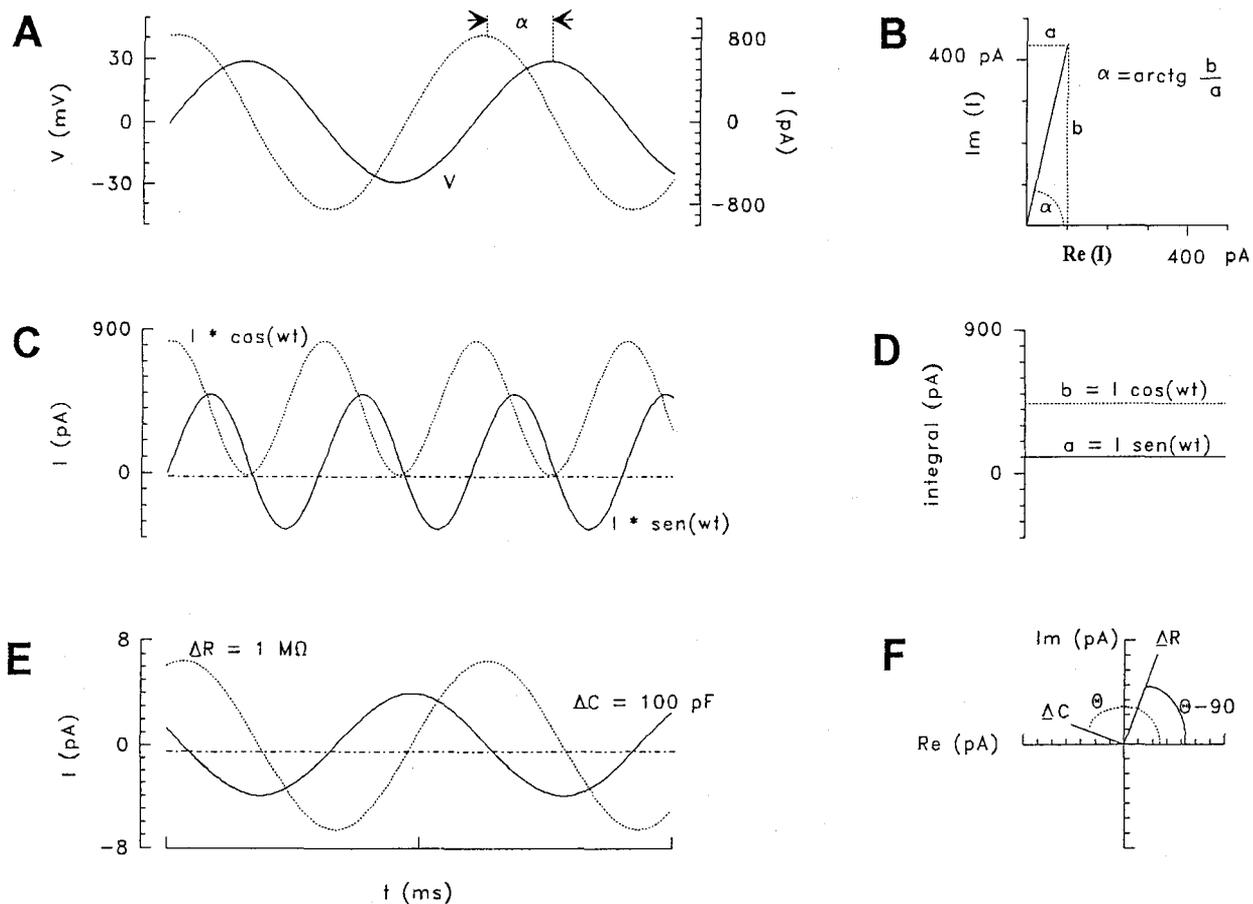


Figura 22. Simulación de la medición de los cambios de capacidad con un detector de fase digital de una célula sometida a fijación de voltaje mediante la técnica de patch-clamp. Los valores de capacidad de membrana (C_m), de resistencia de membrana (R_m) y de resistencia de acceso en serie (R_s) fueron de 5.6 pF, 1G Ω , y 5 M Ω , respectivamente. **A.** La célula fue sometida a una sinusoide de voltaje (V) de 27 mV de amplitud y 833 Hz de frecuencia, resultando una corriente sinusoidal I de la misma frecuencia, y 838 pA de amplitud, desfasada de V un ángulo α de 79.7°. **B.** La corriente resultante (I) se representa en el plano complejo como un vector, definido por dos parámetros: una magnitud ($|I|$), y un ángulo de fase (α) con respecto al eje real $-V$ -. **C.** El detector de fase operó multiplicando la corriente I por una función seno por un lado y por una función coseno por otro, descomponiendo la corriente en dos ondas proporcionales al componente real (Re) e imaginario (Im) de la corriente, respectivamente. **D.** Las respectivas integrales de estas ondas producto dieron dos valores: el primero, a , proporcional a la admitancia real ($Re[\Delta Y]$) y el segundo, b , a la imaginaria ($Im[\Delta Y]$), y a partir de las cuales se pudo calcular α (**B**). **E.** Fue crítico para las medidas de capacidad con el detector de fase determinar el ángulo de fase de ΔI_{C_m} , θ . Se canceló C_m y R_s con el circuito de cancelación del amplificador de patch-clamp. A continuación, se aplicó un ΔI_{R_m} de 1 M Ω que produjo una corriente resistiva pura con un desfase de $\theta-90$ con respecto a la fase de referencia (ωt), lo que permitió identificar θ . Como señal de calibración de la capacidad se generó un ΔI_{C_m} (modificando 100 fF el circuito de compensación de la capacidad) que proporcionó una corriente capacitiva pura, cuyo módulo coincidía con su proyección sobre el eje imaginario cuando la fase del detector era θ . **F.** Representación en el plano complejo de los vectores ΔI_{R_s} y ΔI_{C_m} antes de ajustar de fase del detector (ωt) a θ .

2.6.1.2. Ajuste de fase

Al variar cualquiera de los parámetros del circuito equivalente de membrana (R_s , R_m ó C_m) se produce una modificación del argumento α , de modo que las proyecciones ortogonales de la corriente total sobre los ejes reales e imaginario no coinciden totalmente con los componentes resistivos y capacitivos de la misma, respectivamente. Por ejemplo, un incremento de la R_s de acceso a la célula (ΔI_{R_m}) va a producir una modificación de la fase de la corriente total ($\theta-90^\circ$), de modo que proyección ortogonal de la corriente sobre el eje imaginario va a variar sin que ésto signifique que ha habido un cambio de la capacidad de la célula.

$$\theta - 90^\circ = \arctan \frac{\text{Im}(\Delta I_{R_s})}{\text{Re}(\Delta I_{R_s})} \quad (7)$$

Por ello, fue crítico para las medidas de capacidad con el detector de fase determinar el nuevo ángulo de fase que un ΔI_R ó un ΔI_C , producía con respecto a la fase de referencia (ωt). El procedimiento utilizado consistió (Neher y Marty, 1982, Joshi y Fernández, 1988) en cancelar la impedancia de la célula (estrictamente C_m y R_s) con el circuito de cancelación del amplificador de patch-clamp, con lo que la corriente resultante era anulada. Entonces, se aplicó un ΔI_{R_m} (variando 1 M Ω el circuito de compensación de la resistencia en serie) que produjo una corriente resistiva pura con un desfase de $\theta-90^\circ$ con respecto a la fase de referencia (ωt), lo que permitió identificar θ (Figura 22 F).

El detector de fase digital hace uso a continuación de θ para generar nuevas funciones seno y coseno en fase con la nueva corriente resultante.

2.6.2. Adquisición y registro

El equipo empleado para el registro de la capacidad eléctrica de membrana se esquematiza en la Figura 23. El *detector de fase digital* (Joshi y Fernández, 1988), así como, el programa de adquisición y análisis empleado en medidas de capacidad fueron

Material y métodos

escritos en lenguaje de programación C por el Profesor Alvarez de Toledo. La sinusoide de potencial que se aplicó a la entrada del amplificador de "patch-clamp" (V comando) tuvo una frecuencia de 833 Hz y una amplitud pico a pico de 54 mV. La corriente registrada se midió a dos ángulos, θ y $\theta-90^\circ$, respecto de la fase del potencial sinusoidal (ωt), que se tomó de referencia, tal que, la parte real de la admitancia celular reflejara sólo los cambios resistivos mientras la parte imaginaria sólo los capacitativos. La adquisición fue realizada a una velocidad muestreo de 1 punto/10 ms. En la figura 23 se muestra un esquema del dispositivo experimental para el registro de la capacidad eléctrica de la célula.

2.6.2.1. Calibración de la capacidad y ajuste de fase automático ("Phase Tracking")

Una vez ajustada la fase del detector a θ , como señal de calibración de la capacidad se generó un ΔI_{cm} (modificando 100 fF el circuito de compensación de la capacidad) que proporcionó una corriente capacitativa pura, cuyo módulo coincidía con su proyección sobre el eje imaginario (figura 1 E).

La fase θ fue periódicamente ajustada mediante la técnica de "Phase tracking" (Fidler y Fernández, 1989). Colocando cada cierto tiempo y momentáneamente una resistencia de 1 M Ω en serie con la célula, entre el baño y tierra; lo que produjo un incremento de corriente resistiva, cuyo vector en el plano complejo permitió calcular de nuevo el ángulo $\theta-90^\circ$.

2.6.2.2. Pipetas de registro

En medidas de capacidad eléctrica de membrana, se cubrió la pipeta con un elastómero de silicona (Sylgard 184, Dow Corning Corp., EE.UU.) con el fin de reducir aún más el ruido por conducción dieléctrica del vidrio. La resina precurada (semilíquida)

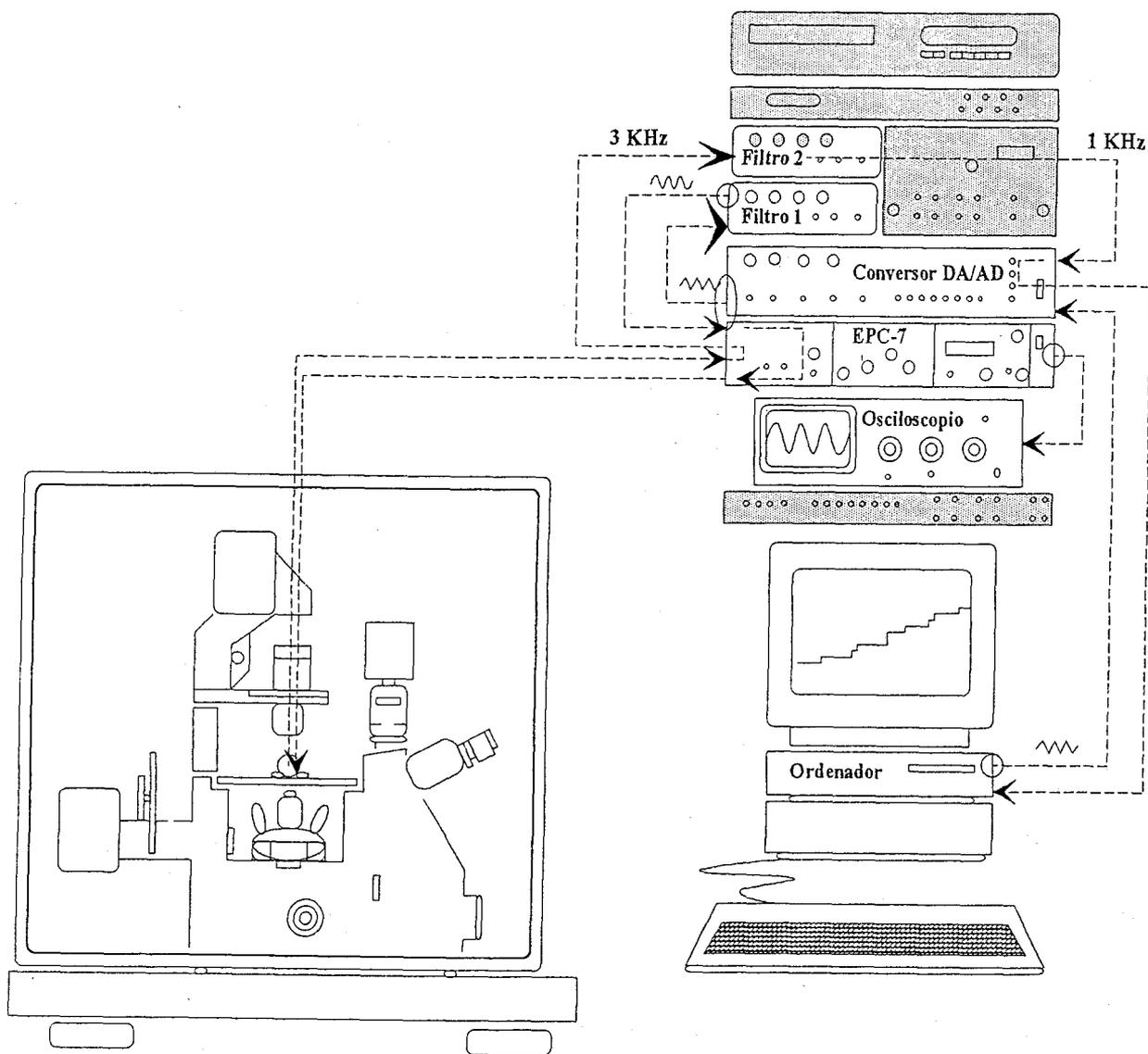


Figura 23. Esquema del dispositivo experimental para el registro de la capacidad eléctrica de la membrana celular

Material y métodos

era aplicada sobre los últimos milímetros de la punta, dejando los últimos micrómetros libres, y con la aplicación de un flujo de aire caliente se terminaba de curar en pocos minutos.

2.7 DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE INDOLAMINAS

Las técnicas amperométricas y voltamétricas Estas técnicas permiten la detección de indolaminas y catecolaminas entre otras, por métodos electroquímicos. Como electrodo se utilizó una fibra de grafito (ver más adelante) conectada a un convertidor I/V y sometida a una diferencia de potencial (Figura 24). La oxireducción de una sustancia produjo una corriente farádica.

2.7.1. Fabricación de electrodos

Se empleó una fibra de carbón de 8 μm de diámetro (cortesía del Prof. Álvarez de Toledo). Se fabricaron dos tipos de electrodos: uno en el que la fibra se recubrió con vidrio (Millar y Willians, 1990; Alvarez de Toledo, Fenández-Chacón y Fernandez, 1993) y otro con polietileno (Chow, von Rüden y Neher, 1992).

En el primer caso, el electrodo se fabricó introduciendo la fibra de carbón en un capilar de borosilicato (Kimax 51) (Figura 25 A). El capilar se estiró como si de un electrodo intracelular se tratara (Figura 25 B), desenchandose los que a la inspección en microscopio no tuviera el vidrio de la punta bien sellado alrededor de la fibra.

La fabricación del otro tipo de electrodo consistía en introducir la fibra en un capilar de polietileno (diámetro interno, 0.8 mm) y estirarlo manualmente utilizando como fuente de calor un soldador eléctrico.

El trozo de fibra que sobresalía de la punta del capilar fue cortado bien bajo lupa

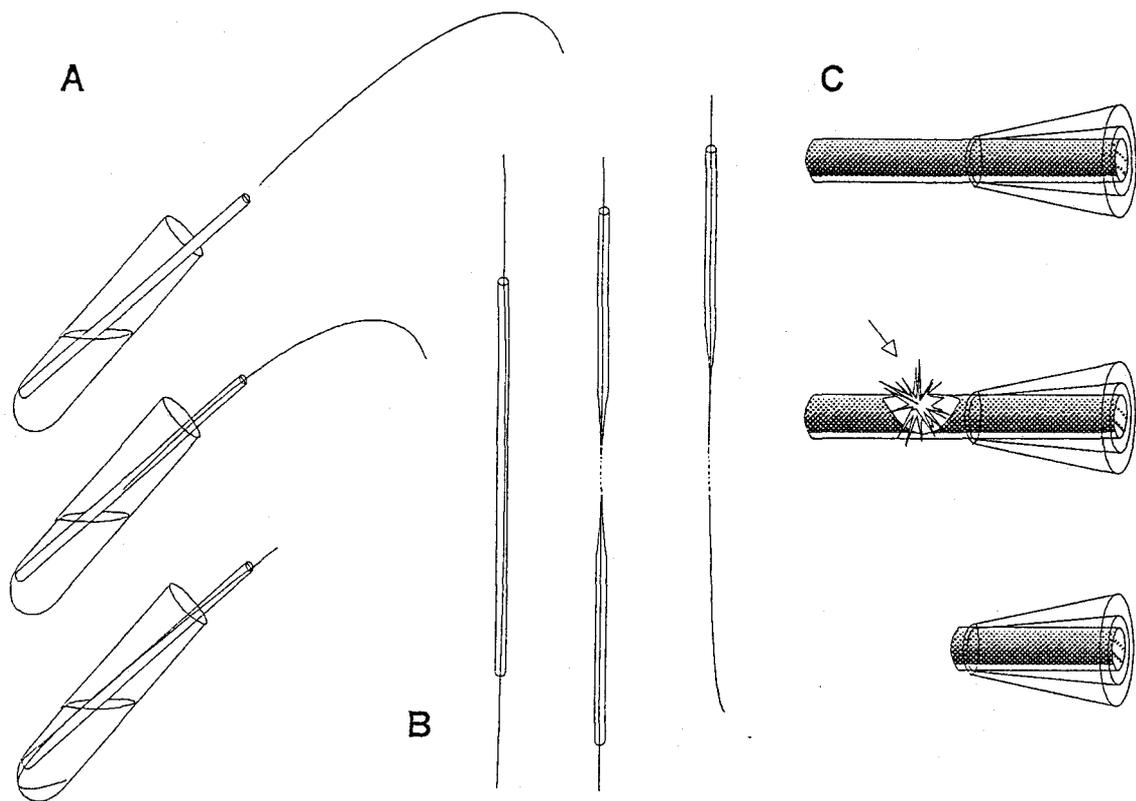


Figura 25. Elaboración de electrodos para amperometría-voltametría. **A.** La fibra de grafito se introdujo en un capilar de vidrio inmerso en un tubo de ensayo con acetona, para facilitar su penetración. **B.** El capilar con la fibra en su interior fue sometido a calor y tracción en un estirador de microelectrodos. **C.** El trozo de fibra que sobresalió del vidrio fue cortado mediante un arco voltaico (flecha).

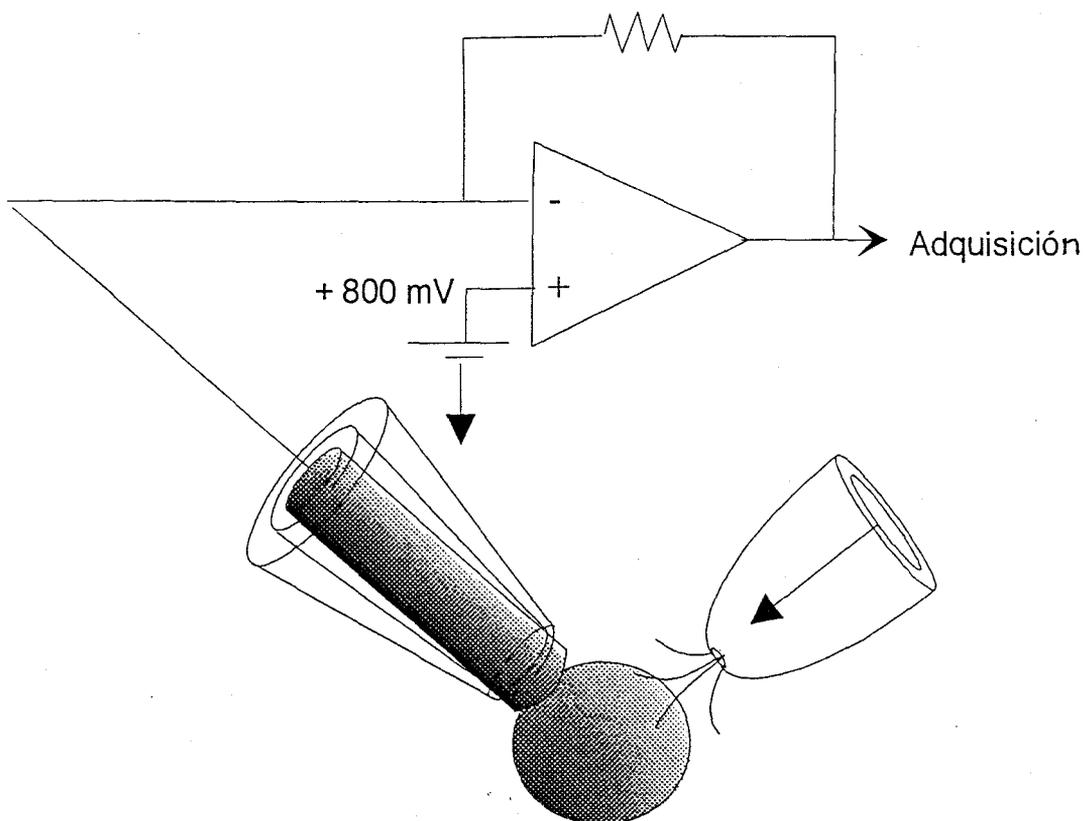


Figura 24. Esquema de la técnica de detección electroquímica de indolaminas y catecolaminas en célula única. La fibra de grafito ($\sim 8 \mu\text{m } \varnothing$) conectada a un convertidor corriente-voltaje se sometió a un potencial equivalente al potencial redox de la sustancia a detectar o superior (p.e., 800 mV). La aplicación de drogas se realizó con una pipete de registro.

estereoscópica, mecánicamente (con hoja de bisturí), o bien bajo control microscópico con un arco voltaico producido por una diferencia de potencial de varios miles de voltios entre la fibra y un filamento de tungsteno (Alvarez de Toledo, comunicación personal) (Figura 25 C). Cortada de este último modo, la fibra parecía tener una mayor sensibilidad. El otro extremo de fibra, previamente, había sido unido a un hilo conductor con pintura de plata, a través del que se conectaba el electrodo al amplificador.

La relación señal ruido del electrodo de polietileno fue mejor que la del vidrio dos ordenes de magnitud, probablemente por el menor coeficiente dieléctrico del polietileno.

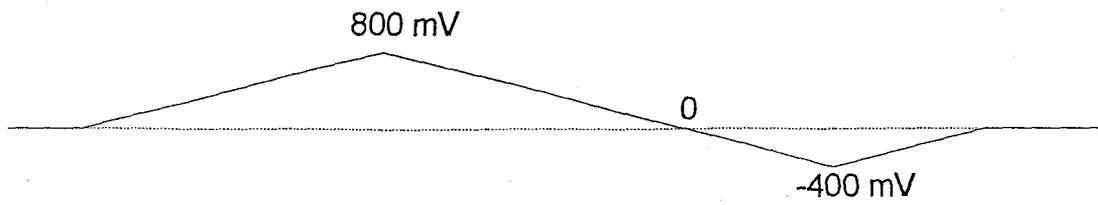
2.7.2. Adquisición y registro

En la modalidad de amperometría se fijó el potencial de la fibra a un nivel constante (600 mV u 800 mV) y se hicieron registros con una frecuencia de muestreo entre 100 y 1000 Hz. Mientras que, en la modalidad de voltametría el electrodo se sometió a un potencial en rampa, con lo que su resolución temporal fue inferior (< 10 Hz) pero que permitió la discriminación e identificación de distintas sustancias redox en el medio, a partir de su perfil corriente-voltaje.

Las mediciones voltamétricas y amperométricas se realizaron con un amplificador de "patch-clamp" utilizando un ordenador Atari conectado con una interfase Instrutech para generar protocolos de voltaje y para la conversión analógico-digital de la señal, que fueron almacenados en video VHS a través de un procesador PCM.

En modo voltamétrico se generaron rampas de voltaje tal como se muestra en la Figura 26. los componentes lineales de la corriente registrada se substrajeron del componente farádico.

Voltaje



Corriente

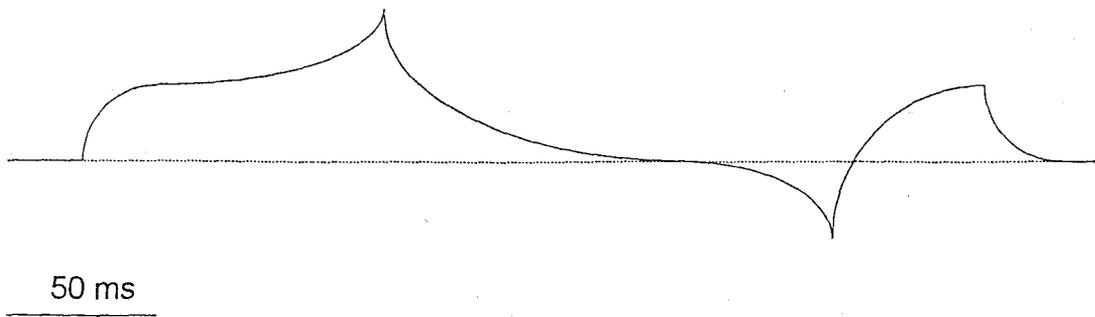


Figura 26. Al aplicar una rampa de potencial a un electrodo de fibra de carbono inmerso en el baño de la camarita de registro, se produjeron unos transientes lineales (capacitivos y resistivos) que fueron cancelados mediante substracción digital con el programa "acquire" de Atari.

RESULTADOS, CALCIO CITOSÓLICO



3.1. LA SEÑAL DE Ca^{2+} INDUCIDA POR NA

3.1.1. NA induce incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un curso temporal bimodal

La aplicación extracelular de NA indujo modificaciones transitorias de los niveles basales del calcio citosólico libre en la célula pineal.

En la Figura 27, se ilustra un ejemplo del efecto de la NA en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, medido en una única célula. Desde una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo de 35 nM, y tras una latencia de 15 s del comienzo de la aplicación, los niveles de Ca^{2+} citosólico aumentaron rápidamente (5.2 s) hasta alcanzar un valor máximo de 220 nM, decreciendo también de forma rápida. No obstante, antes de retornar a los niveles basales de nuevo, se produjo una segunda elevación transitoria del Ca^{2+} citosólico de más de 5 minutos de duración (figura 27 A).

En ésta célula (figura 27 A), después del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por NA en solución

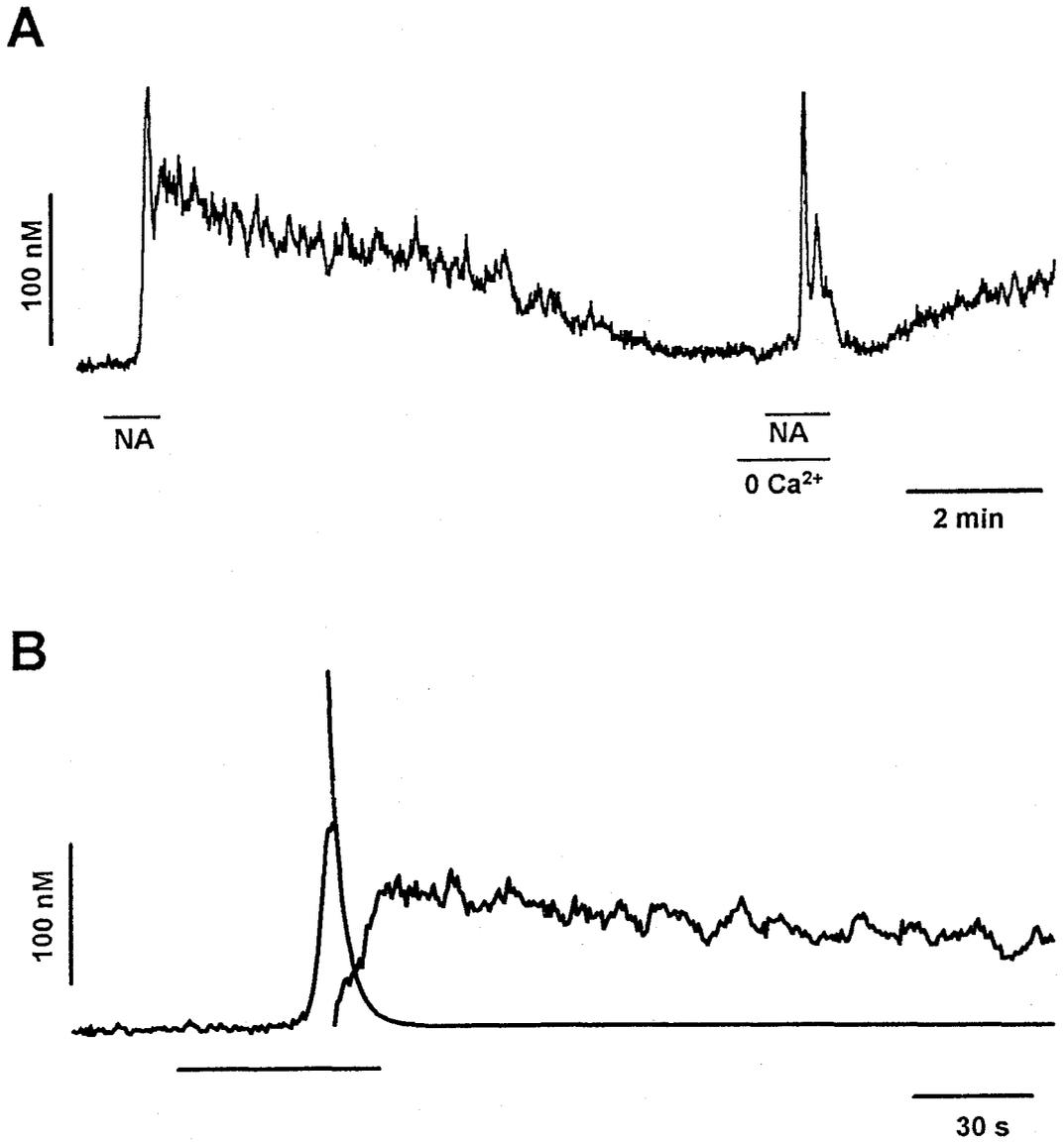


Figura 27. Modificaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ tras la aplicación externa de NA ($4 \mu M$) a una célula. **A.** Registro en presencia (2.5 mM) y ausencia de Ca^{2+} extracelular ($0 Ca^{2+}$). **B.** Separación de los componentes del transitorio de Ca^{2+} registrado en presencia de Ca^{2+} externo

control se cambió la solución a una de 0 Ca^{2+} y tras un intervalo de 40 s, se dio un segundo pulso de NA que indujo también, después de una latencia de 15 s, un aumento rápido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que alcanzó un valor máximo de 205 nM, seguido de un segundo transitorio rápido de menor amplitud que el primero, antes de volver a los niveles basales. Tras la vuelta a la solución control, generalmente se produjo un incremento de Ca^{2+}_i por la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo (véase más adelante).

Así pues, en solución de 0 Ca^{2+} (solución sin calcio añadido, con o sin EGTA, 1 mM), no se observaron elevaciones del Ca^{2+} citosólico lentas y mantenidas en meseta, mientras que, en solución control, el curso temporal de la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por NA fue bimodal. Un primer $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espiga seguido de un segundo en meseta. En la figura 27 B se muestra la meseta de la señal de calcio tras la substracción de la espiga a la señal en presencia de Ca^{2+} que se muestra en A.

3.1.2. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está mediado por receptores adrenérgicos

α_1

La estimulación de las células pineales con fenilefrina (PE), un agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_1 , indujo incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de características similares a los inducidos por NA. Tras una latencia del comienzo de la aplicación, se produjo una elevación y descenso rápidos del Ca^{2+} citosólico, en espiga, seguidos de una elevación más lenta de los niveles, en meseta (Figura 28). Sin embargo, la aplicación simultánea de PE con prazosín (1 μM), un antagonista específico de los receptores α_1 , no tuvo efecto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=4$).

Por otro lado, la presencia en el baño de un antagonista β adrenérgico, propranolol (5 μM), no impidió que la aplicación de NA indujera incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figura 28). En el registro que aparece en la figura 28, PE y NA indujeron en la misma célula transitorios en espiga de distinta amplitud y con distintos tiempos de subida. Sin

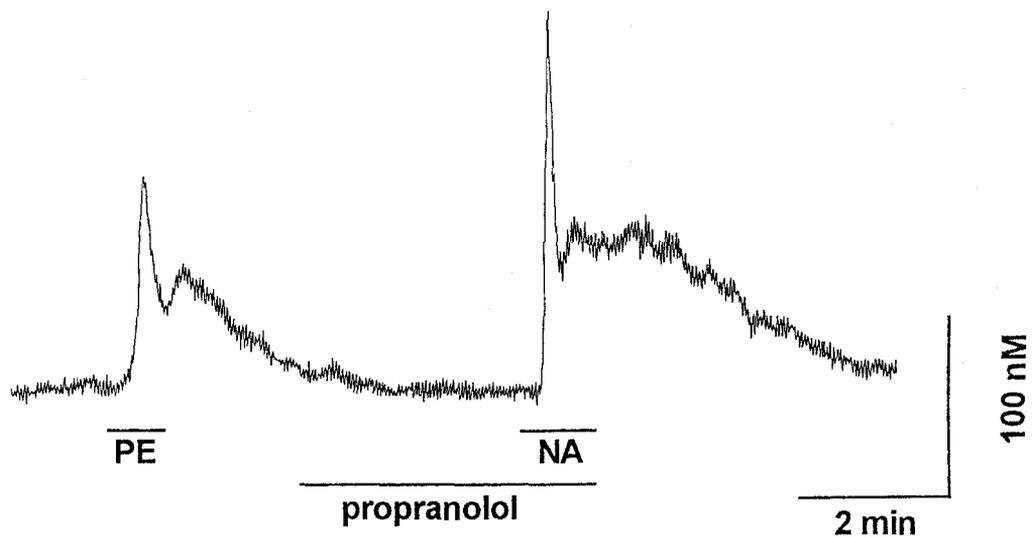


Figura 28. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por NA está mediado por la activación de receptores α_1 -adrenérgicos. Un primer pulso de PE ($4 \mu M$) de 45 s de duración, tras una latencia de ~ 16 s, produjo una elevación rápida ($\sim 7,5$ s) del Ca^{2+} citosólico desde un valor basal de 25 nM hasta uno final de 135 nM, seguida de una meseta de ~ 3 min de duración. Posteriormente, se expuso la célula a una solución con propranolol ($5 \mu M$), y al cabo de 4 min se aplicó NA, $4 \mu M$ durante 1 min. Tras una latencia de ~ 15 s se produjo otro transitorio rápido ($\sim 3,8$ s) que alcanzó un valor de 230 nM, seguido por una meseta de unos 5 min de duración.

embargo, la amplitud promedio de los transitorios de Ca^{2+} obtenidos con NA, 2 μM , fue de 209 ± 55 nM (media \pm e.e.m., $n = 5$), muy similar a la obtenida con 2 μM de PE (Tabla V). No obstante, en éste trabajo no se ha comparado la potencia relativa de estos agonistas para otras concentraciones.

Cuando se emplearon concentraciones altas de isoproterenol ($\geq 10 \mu\text{M}$), agonista de los receptores β -adrenérgicos que incrementa los niveles de AMPc, se produjeron elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de distintas amplitudes y que fueron abolidos en presencia de prazosín (1 μM). No obstante, concentraciones inferiores de isoproterenol ($\leq 1 \mu\text{M}$) no produjeron modificaciones de los niveles de Ca^{2+} citosólicos ($n=7$). Por otro lado, la aplicación de un análogo de AMPc permeable a través de las membranas (dibutilil adenosín 3':5'-monofosfato cíclico, 1 mM) no tuvo efecto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=3$). Estos datos sugieren, por tanto, que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la aplicación de NA se produce exclusivamente a través de la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos.

3.1.3. Curva dosis-respuesta ($[\text{PE}]$ - $[\text{Ca}^{2+}]_i$)

En la Figura 29 se muestra una curva dosis-respuesta obtenidas en un total de 83 células, en la que se representan las amplitudes de los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la fase de espiga de la respuesta, tras la estimulación con distintas $[\text{PE}]$ (0.5, 1, 2, 5 y 10 μM). El rango dinámico de concentraciones donde se obtuvo respuesta gradual fue muy estrecho: ~ 0.5 -2 μM . Concentraciones menores de 0.5 μM fallaban con frecuencia en inducir transitorios de Ca^{2+} mientras que $[\text{PE}]$ mayores de 2 μM producían $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ próximos a niveles máximos.

Los valores de amplitudes de los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenidos experimentalmente para distintas concentraciones se ajustaron satisfactoriamente a una función de Michaelis-Menten del tipo

Resultados

$$[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i_{max}} \frac{[PE]}{[PE] + K_M} \quad (8)$$

donde $[Ca^{2+}]_{i_{max}}$ representa la amplitud promedio de las espigas a concentraciones saturantes de PE, y K_M la $[PE]$ a la que se alcanzó la mitad de la amplitud máxima. Los valores de $[Ca^{2+}]_{i_{max}}$ y K_M que permitieron el mejor ajuste fueron 225 nM y 0.6 μ M, respectivamente (figura 29). La máxima pendiente de la curva estuvo comprendida entre 0.5-1 μ M de PE (29 \pm 14% y 73 \pm 11% de la $[Ca^{2+}]_{i_{max}}$, respectivamente). La mayor parte de los experimentos que se presentan a continuación se han realizado con una $[PE]$ de 2 μ M, que supone un 87.5 \pm 11% de la $[Ca^{2+}]_{i_{max}}$.

El valor promedio de la amplitud de la primera espiga de Ca^{2+} evocada por PE 2 μ M en presencia de Ca^{2+} externo fue valor muy similar al obtenido en ausencia de Ca^{2+} externo (Tabla V).

Tabla V. Amplitud de la señal de Ca^{2+} (media \pm e.e.m.) inducidas por distintas concentraciones de agonista en presencia y ausencia de Ca^{2+} externo.

| agonista | concentración (μ M) | Amplitud | |
|----------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | control | 0 Ca^{2+} |
| PE | 2 | 195.8 \pm 25.3 (n=33) | 191.3 \pm 31.6 (n=23) |
| NA | 2 | 209 \pm 55 (n=5) | - |
| ACh | 50 | 375 \pm 47 (n=25) | 116.2 \pm 18 (n=37) |

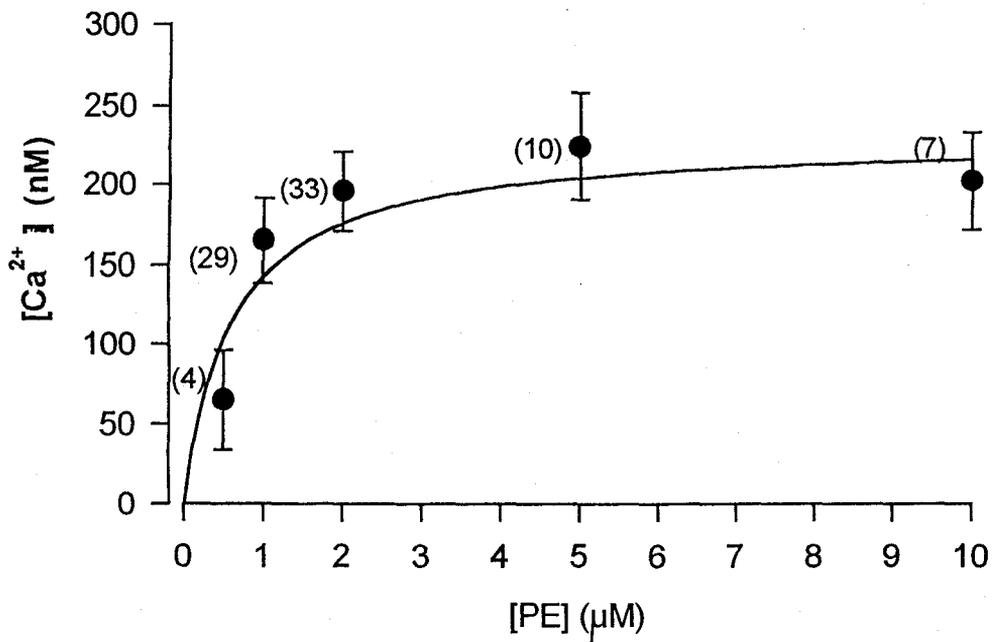


Figura 29. Curva dosis respuesta de PE. Media y error estándar de las amplitudes de los $\Delta[Ca^{2+}]_i$ para concentraciones de 0.5, 1, 2, 5, 10 μM de PE ($n = 83$). Los valores experimentales mostraron convergencia con el ajuste a una cinética de Michaelis-Menten. La amplitud máxima promedio fue ~ 225 nM, alcanzándose con 2 μM PE un $87.5 \pm 11\%$ (media \pm e.e.m.). Los transitorios de Ca^{2+} tuvieron una amplitud mitad de la máxima a una [PE] de 0.6 μM . La pendiente de la relación dosis-respuesta fue máxima en un rango de [PE] entre 0.5 μM ($29 \pm 14\%$) y 1 μM ($73 \pm 11\%$)

3.1.4. Liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares

Se analizaron, en un muestra de 20 células, el curso temporal del aumento y la disminución de la señal de Ca^{2+} inducida por el agonista α_1 -adrenérgico (PE, 2 μM , en solución externa de 0 Ca^{2+}).

3.1.4.1. Cinética de liberación de Ca^{2+}

La velocidad del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ o pendiente de subida del transitorio de Ca^{2+} , $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM/s), se calculó como la diferencia entre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máxima y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal dividida por el tiempo empleado desde el inicio de la respuesta hasta alcanzar el máximo, $t_{0-100\%}$. La velocidad del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ varió de célula a célula desde valores muy lentos (2.5 nM/s) a otros varios ordenes de magnitud mayores (224.4 nM/s).

En la Figura 30 A se muestran tres transitorios de liberación de Ca^{2+} con muy distintas fases de subida registrados en tres células distintas. En la parte B de la figura se representa la velocidad de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máxima en 20 células, observándose la existencia de una relación directa entre la pendiente de subida de la señal de Ca^{2+} y la concentración máxima de Ca^{2+} citosólico alcanzada.

Por otra parte, se estudió la cinética del decaimiento de la señal de Ca^{2+} en estas mismas 20 células. En todas los casos el decremento de la espiga de Ca^{2+} se ajustó satisfactoriamente a una función monoexponencial como se ilustra en el ejemplo de la Figura 31 A. La constante de tiempo del decaimiento varió de célula a célula entre 4.7-20.1 s. En células con transitorios de gran amplitud la constante de decaimiento fue rápida, mientras que en aquellas con transitorios pequeños fue lenta. En la figura 31 B se observa esta relación inversa entre la amplitud de la señal y la constante de tiempo del decremento de calcio en el total de las células analizadas.

Las diferencias en las características cinéticas de las espigas de Ca^{2+} encontradas en distintas células (figuras 30-31), se deben parcialmente al empleo de

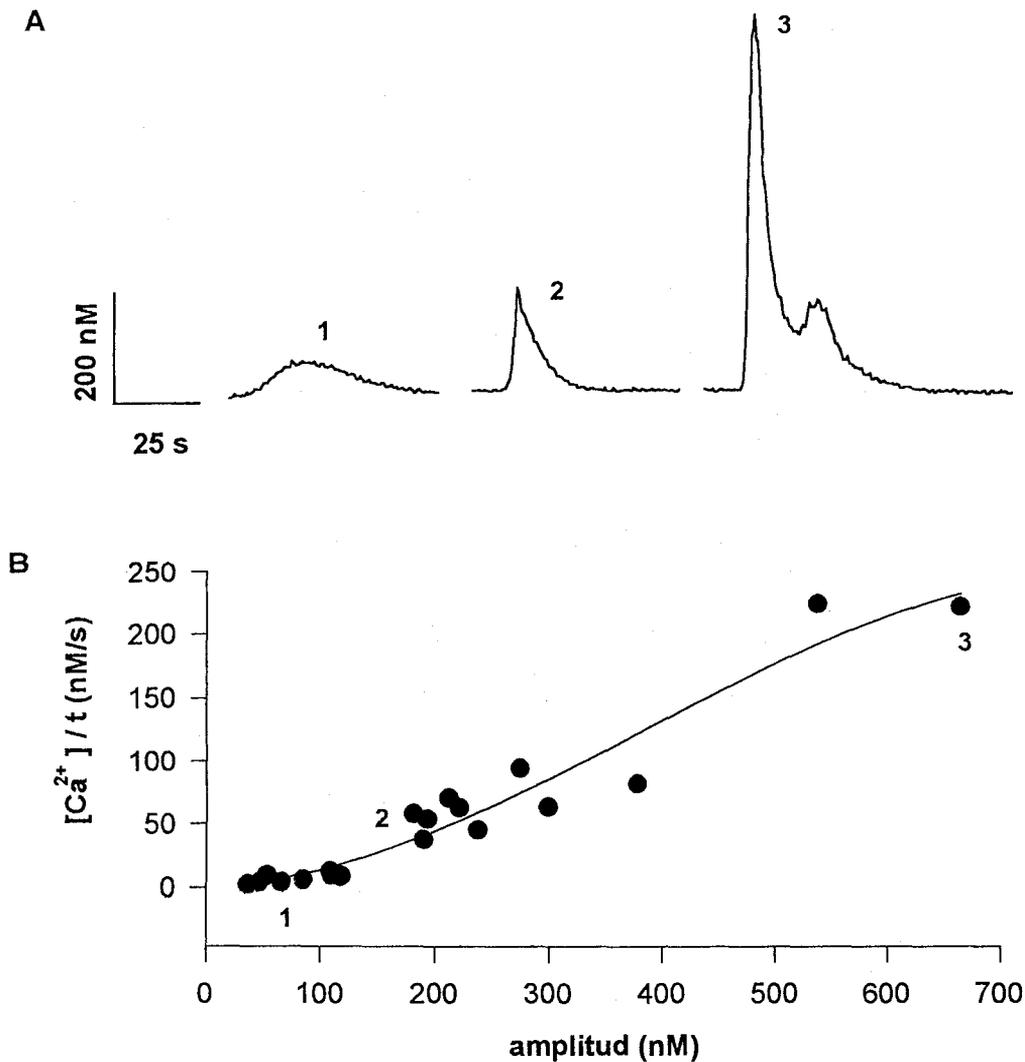


Figura 30. Curso temporal del incremento de la señal de Ca^{2+}_i en ausencia de Ca^{2+} externo. **A.** Registro de los incrementos de calcio en respuesta a la aplicación de PE, 2 μM , en tres células. En el panel izquierdo la pendiente del incremento de Ca^{2+} fue de 4.3 nM/s. En el panel medio 58.7 nM/s, y en el de la derecha, 221,6 nM/s. **B.** Relación entre la pendiente de la señal de Ca^{2+} y la $[Ca^{2+}]_i$ máxima alcanzada, en 20 células. Los números próximos a los círculos hacen referencia a los transitorios que se muestran en A. Los datos experimentales se ajustaron con una curva de regresión de tercer orden ($r = 0.967$).

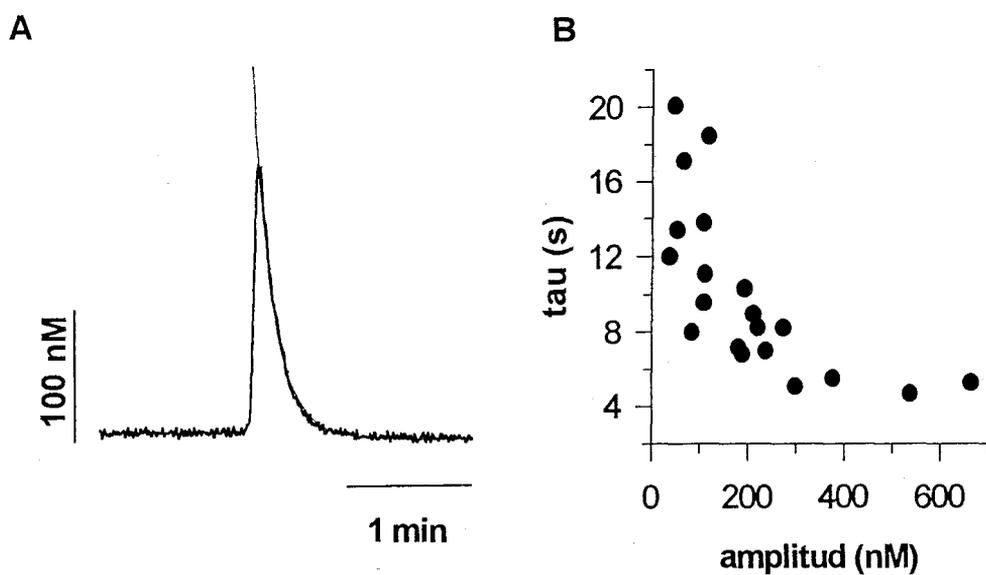


Figura 31. Curso temporal del decremento de la señal de Ca²⁺, tras la aplicación de PE, 2 μM, en ausencia de Ca²⁺ extracelular. **A.** Transitorio de liberación inducido por la aplicación del agonista durante 15 s. La elevación neta de la [Ca²⁺], 194 nM, fue rápida ($\Delta[Ca^{2+}]/t = 53.9$ nM/s) y decayó de modo exponencial con una τ de 10.3 s. **B.** Relación entre la amplitud de la señal de Ca²⁺ y la constante de tiempo del decremento en 20 células.

distintos tiempos de incubación con el fluoróforo (5-50 minutos), de forma que la capacidad de tamponamiento del Ca^{2+} pudo variar notablemente de célula a célula. Es por ello que en la mayoría de los experimentos que se presentan a continuación las células se incubaron de forma regular durante 10-15 minutos, obteniéndose de ésta forma señales con pendiente de subida $>$ de 35 nM/s.

3.1.4.2. Liberaciones múltiples

En el 30% de las células, el ajuste exponencial del curso temporal del decaimiento de la señal de liberación registrada en 0 Ca^{2+} , con o sin 1 mM EGTA añadido, puso de manifiesto la existencia de un segundo evento de liberación. En la Figura 32 A se representa la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares producida por la aplicación de PE en ausencia de Ca^{2+} extracelular. La línea roja muestra el ajuste exponencial de la fase de relajación del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$. En el panel derecho de la figura, se muestra la misma señal pero tras la sustracción a la misma del ajuste exponencial. De este modo, se puede evidenciar un segundo componente transitorio, de menor amplitud y de activación más lenta que el primero, posiblemente debido a una segunda liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares. En algunas células, incluso se observaron más de dos espigas. En la Figura 33 se ilustra una señal de Ca^{2+} constituida por tres eventos transitorios.

En un 15% de células, no se distinguió claramente el segundo componente hasta ajustar el decaimiento de la señal de Ca^{2+} a una función exponencial simple (Figura 32 B), evidenciándose entonces una clara inflexión en el curso del decremento de la señal. En el 55% de las células registradas se observó una sola espiga de liberación.

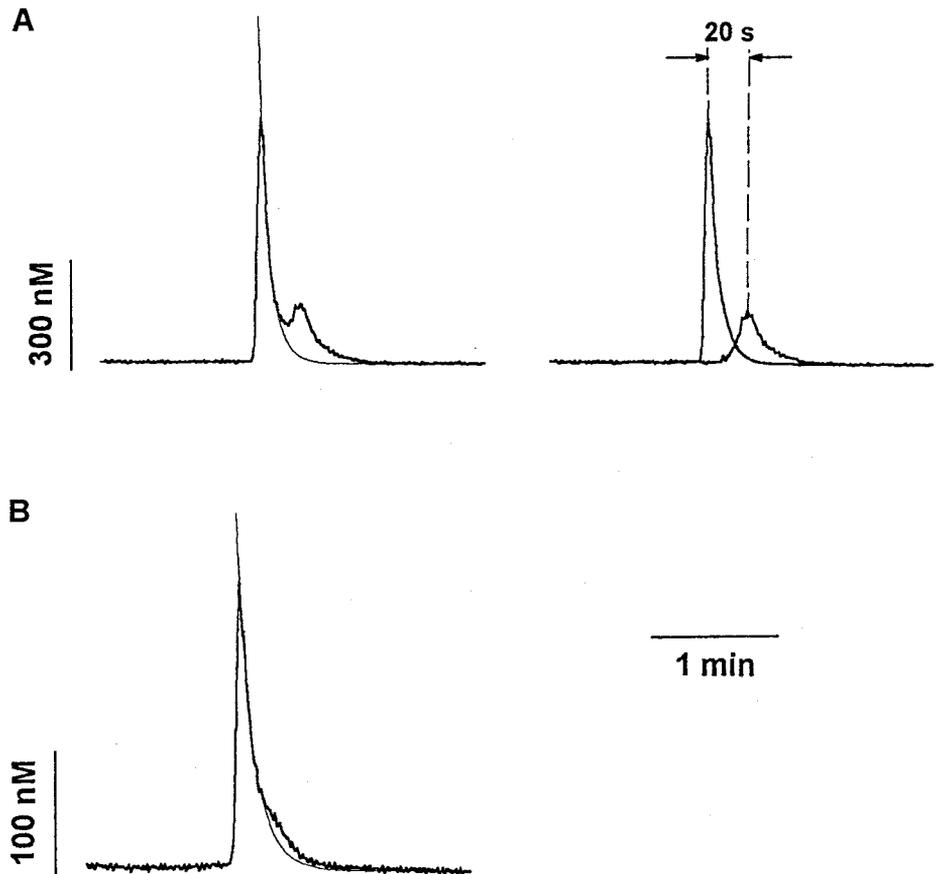


Figura 32. Segundo componente de la señal de Ca^{2+} , registrada en ausencia de Ca^{2+} extracelular tras la aplicación de PE, $2 \mu\text{M}$, durante 15 s. **A.** Transitorio de Ca^{2+} compuesto por dos espigas. La primera fue rápida ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]/t = 221.6 \text{ nM s}^{-1}$) con una amplitud neta de 665 nM y un decremento exponencial ($\tau = 5,3 \text{ s}$). La amplitud de la segunda espiga fue de 146 nM y decayó exponencialmente con una τ de 8.77 s. En el panel de la derecha se han separado las dos espigas mediante la substracción al transitorio de Ca^{2+} del curso del decaimiento exponencial del primer evento. **B.** Transitorio de liberación registrado en otra célula. La elevación neta de la $[\text{Ca}^{2+}]$, 222 nM, fue rápida ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]/t = 63.4 \text{ nM/s}$) y decayó de modo exponencial con una τ de 8.3 s. El ajuste exponencial permitió distinguir una inflexión en el curso temporal del decrecimiento debida probablemente a un segundo evento de liberación.

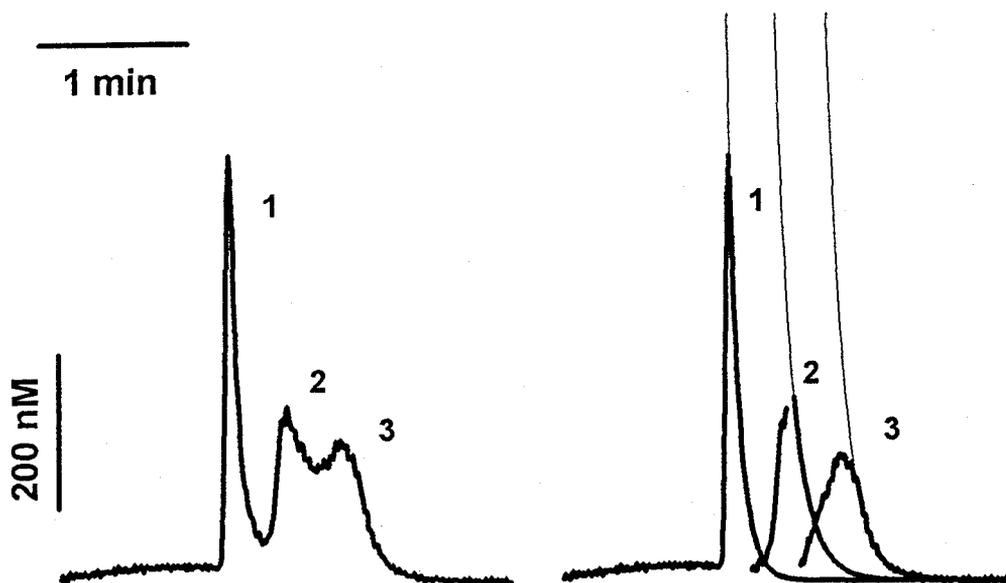


Figura 33. Múltiples liberaciones de calcio inducidas por una única aplicación de 2 μM PE, en 0 Ca^{2+} externo (1 EGTA). Señal de liberación formada por tres eventos transitorios solapados en el tiempo, registrada en otra célula. La aplicación del agonista (50 s) indujo una elevación súbita ($t_{0-100\%} \sim 2,4$ s) de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que llegó a 594 nM y posteriormente decayó exponencialmente con una τ de 4,7 s, los niveles volvieron a incrementarse por segunda vez y tercera vez hasta 283 nM y 239nM, respectivamente para por último decaer con un curso monoexponencial ($\tau \sim 7,4$ s) y alcanzar los valores basales de nuevo (~ 56 nM).

3.1.4.3. Duración de la liberación

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la duración de la señal de Ca^{2+} en función de la duración de la aplicación del agonista (PE, 2 μM) se analizó en un grupo de 11 células donde el incremento de Ca^{2+} fue > 35 nM/s. Con aplicaciones muy cortas, 10-15 s, la duración de la liberación de Ca^{2+} fue de 30-35 s, mientras que con aplicaciones prolongadas, 60 s, los transitorios duraron cerca de 80 s (Figura 34). En general, la duración del incremento de Ca^{2+} fue 10-20 s superior al tiempo de aplicación, incluso en células donde la aplicación fue extremadamente prolongada. Por ejemplo, en una célula donde la aplicación fue de 255 s, la señal de Ca^{2+} duró 265 s (no se muestra en la figura).

La duración de la primera liberación de calcio, medida en la mitad de la amplitud máxima del transitorio ($\text{ancho}_{1/2}$), fue menor a mayor amplitud de la respuesta (Figura 35). Así mismo, las células en las que la amplitud de la liberación fue mayor de ~ 250 nM presentaron un claro segundo evento de liberación (figura 35 B, círculos blancos). Por debajo de este valor, no se detectó un segundo $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figura 35 B, círculos negros). La amplitud media de las respuestas con un segundo componente fue 399 ± 68.7 (media \pm e.e.m., $n=6$) mientras que con un único componente fue 150 ± 18.1 , ($n=18$). En el primer caso, el $\text{ancho}_{1/2}$ fue 5.5 ± 0.35 s (media \pm e.e.m.), mientras que en el segundo 14.9 ± 1.77 s.

Por tanto, el aumento de la duración del $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ con el tiempo de aplicación del agonista se produjo fundamentalmente a expensas de la aparición de una segunda espiga, puesto que la espiga inicial permaneció relativamente constante en duración (figura 35 A).

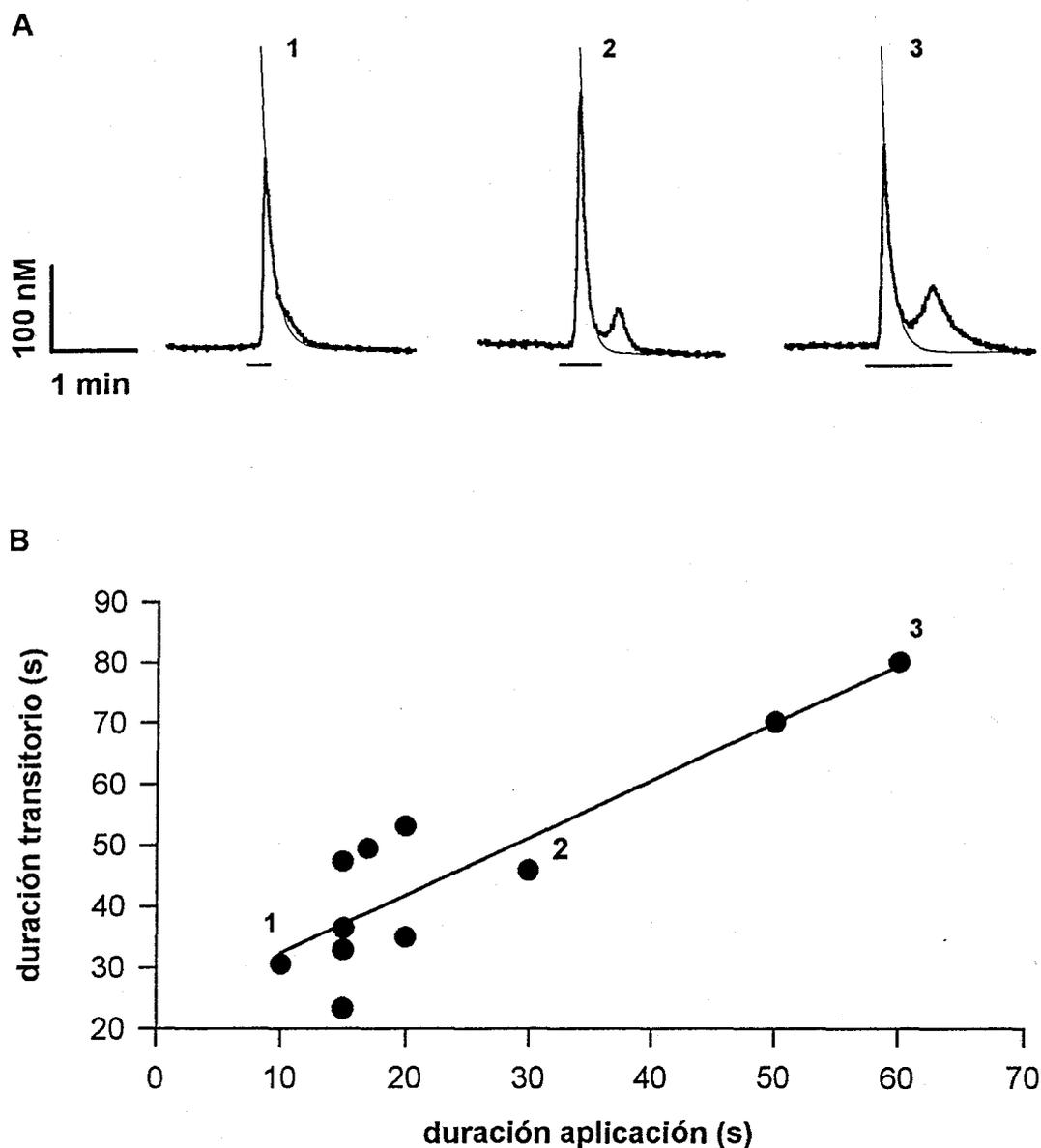


Figura 34. En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la duración de la señal de Ca^{2+} aumenta con la duración de la aplicación del agonista (PE, $2 \mu\text{M}$). **A.** Registro de los transientes de liberación de calcio en tres células en las que se aplicó el agonista durante 10, 30 y 60 s (panel izquierdo, central y derecho, respectivamente). La duración total de la señal de calcio fue 30, 46 y 80 s, respectivamente. **B.** Relación entre la duración de la aplicación y la duración del transitorio de liberación de Ca^{2+} en 11 células en las que las señales de Ca^{2+} tuvieron una pendiente de subida $> 35 \text{ nM/s}$. Los datos mostraron buena correlación lineal ($r = 0.884$). Los números próximos a los círculos hacen referencia a los transitorios de calcio representados en A.

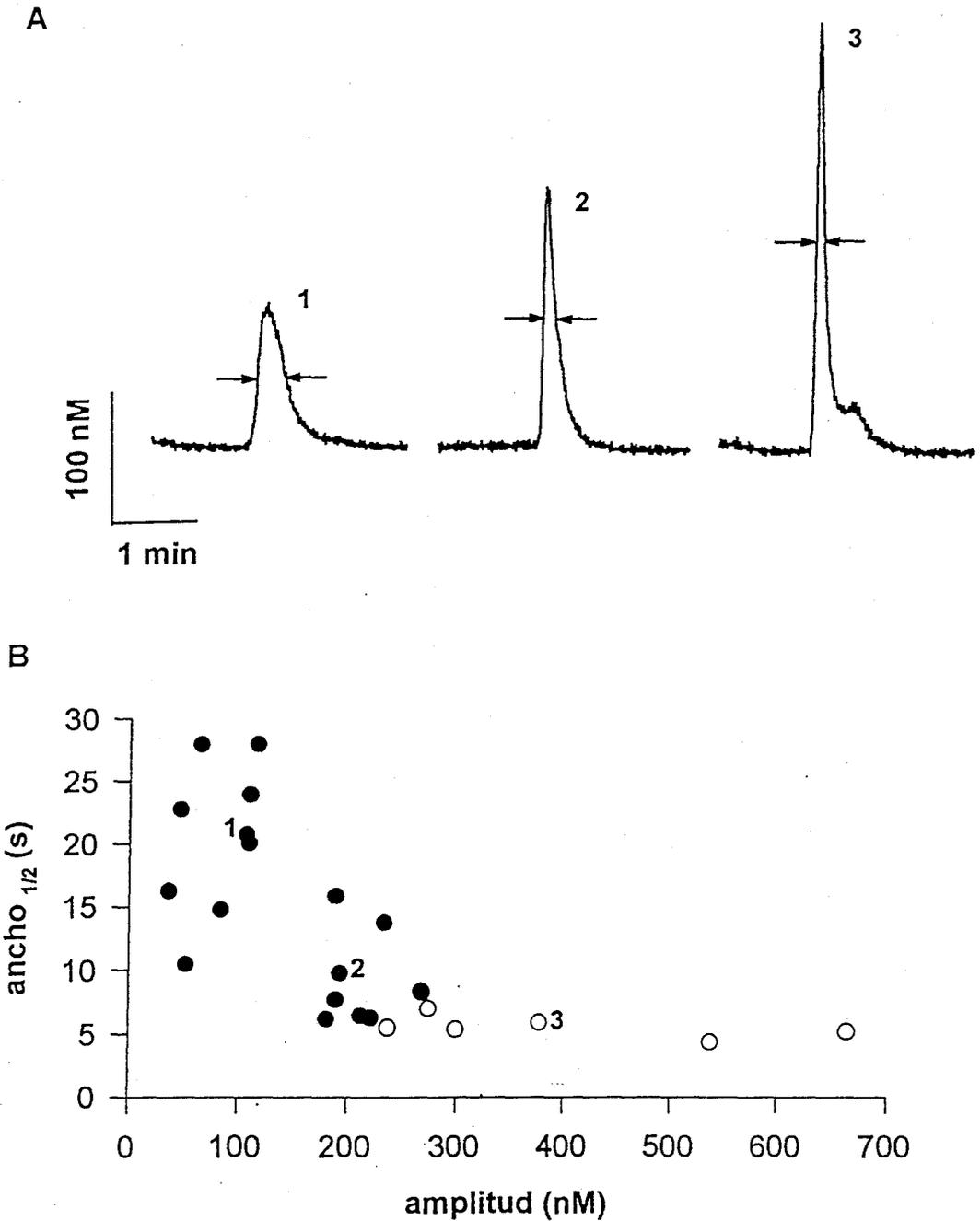


Figura 35. Los transitorios de Ca^{2+} de ≥ 250 nM fueron, generalmente, múltiples. **A.** Incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de distintas amplitudes (108, 194 y 378 nM, respectivamente) y ancho $_{1/2}$ (20.8, 9.8, y 5.9 s, respectivamente) obtenidos en tres células tras la aplicación de PE (2 μM). **B.** Relación entre la amplitud de la liberación de Ca^{2+} y el ancho $_{1/2}$ en 24 células. Los transitorios donde se distinguieron con nitidez varios eventos de liberación se representan con círculos blancos. Los números adyacentes a los símbolos se refieren a los transitorios respectivos en A.

3.1.5. Duración de la entrada de Ca^{2+}

La duración del transitorio de Ca^{2+} en presencia de Ca^{2+} externo aumentó progresivamente en duración con aplicaciones prolongadas de PE. En la Figura 36 A se muestran los registros de la concentración de Ca^{2+} citosólico de 3 células en las que la aplicación de PE duró 10, 30 y 60 s, respectivamente. Aplicaciones breves, 10 s, indujeron respuestas de una duración ligeramente mayor que la obtenida en 0 Ca^{2+} , mientras que aplicaciones relativamente prolongadas, 60 s, produjeron respuestas proporcionalmente más duraderas, unas 3 veces la duración de la señal obtenida en ausencia de Ca^{2+} externo, en parte debida a la lentitud de la fase de bajada de la meseta (τ 64-78 s para aplicaciones de 30-60 s, respectivamente). Por tanto, el aumento en la duración de la respuesta dependió fundamentalmente del aumento de la duración de la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo, fase de meseta. En la figura 36 B se representa esta relación en 18 células.

3.2. LA SEÑAL DE Ca^{2+} INDUCIDA POR ACh

3.2.1 ACh induce incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un curso temporal unimodal

La aplicación extracelular de ACh indujo un aumento transitorio de los niveles de calcio libre citosólico con un curso temporal, generalmente, unimodal.

En la Figura 37 A se ilustra el curso temporal de dos transitorios de Ca^{2+} inducidos por dos aplicaciones consecutivas de ACh. Ambos, tras una latencia similar desde la aplicación del agonista (~ 7 s), se desarrollaron con una cinética relativamente rápida (28 nM/s y 24 nM/s, respectivamente) y alcanzaron un máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde donde decrecieron con un curso monotónico que se ajustó satisfactoriamente a una función monoexponencial (τ : 13.8 s y 12.3 s, respectivamente).

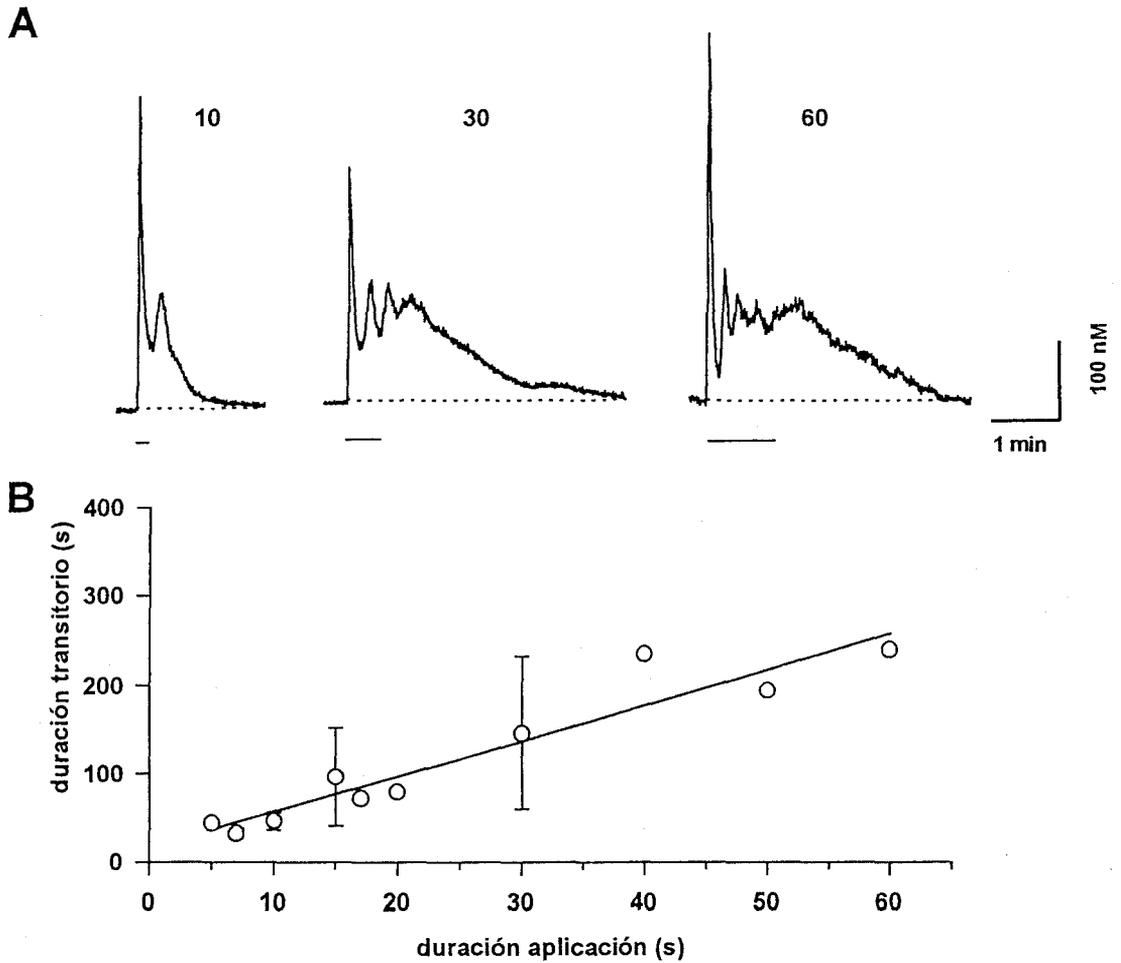


Figura 36. Relación entre la duración del transitorio de Ca^{2+} y la duración de la aplicación del agonista (PE, $2 \mu\text{M}$), en presencia de Ca^{2+} extracelular. **A.** Registros de los transitorios de Ca^{2+} en tres células donde el agonista se aplicó durante 10, 30 y 60 s (panel izquierdo, central y derecho, respectivamente). Las duraciones de los transitorios (líneas de puntos) fueron 161 s, 467 s y 500 s, respectivamente. **B.** Representación de la relación entre la duración de la aplicación del agonista y la duración del transitorio de Ca^{2+} en 18 células. La línea continua representa el ajuste lineal de los datos ($r=0.948$).

Así, en contraste con la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NA, en las células pineales, la inducida por ACh fue unimodal con un decremento monotónico característico.

3.2.2. Liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular

En ausencia de calcio extracelular, la aplicación de ACh produjo una elevación transitoria de los niveles de calcio citosólicos con un curso temporal similar al que se indujo con ACh en solución control pero de menor amplitud. En la figura 37 B se muestra una señal de liberación de Ca^{2+} inducida con ACh, 50 μ M en solución de 0 Ca^{2+} . Tras una latencia de ~ 7 s la aplicación de ACh, indujo un incremento del Ca^{2+} citosólico con una pendiente de 63 nM/s hasta un nivel máximo desde donde decreció exponencialmente con una τ de 9 s. El promedio de las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} obtenidos en 0 Ca^{2+} , representó sólo una tercera parte del promedio de amplitudes registradas en solución control (Tabla V). Por tanto, aparte de la señal de Ca^{2+} inducida por ACh en solución control se debió a liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares.

3.2.3. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ está mediado por receptores muscarínicos

La aplicación extracelular de CCh a una célula, agonista muscarínico, indujo transitorios de Ca^{2+} de características similares a los observados con ACh como se muestra en la Figura 38 (n=14). El incremento de Ca^{2+} inducido por ACh se bloqueó cuando 2-3 minutos antes de aplicar ACh se expuso la célula a una solución con atropina (10 μ M, n=3).

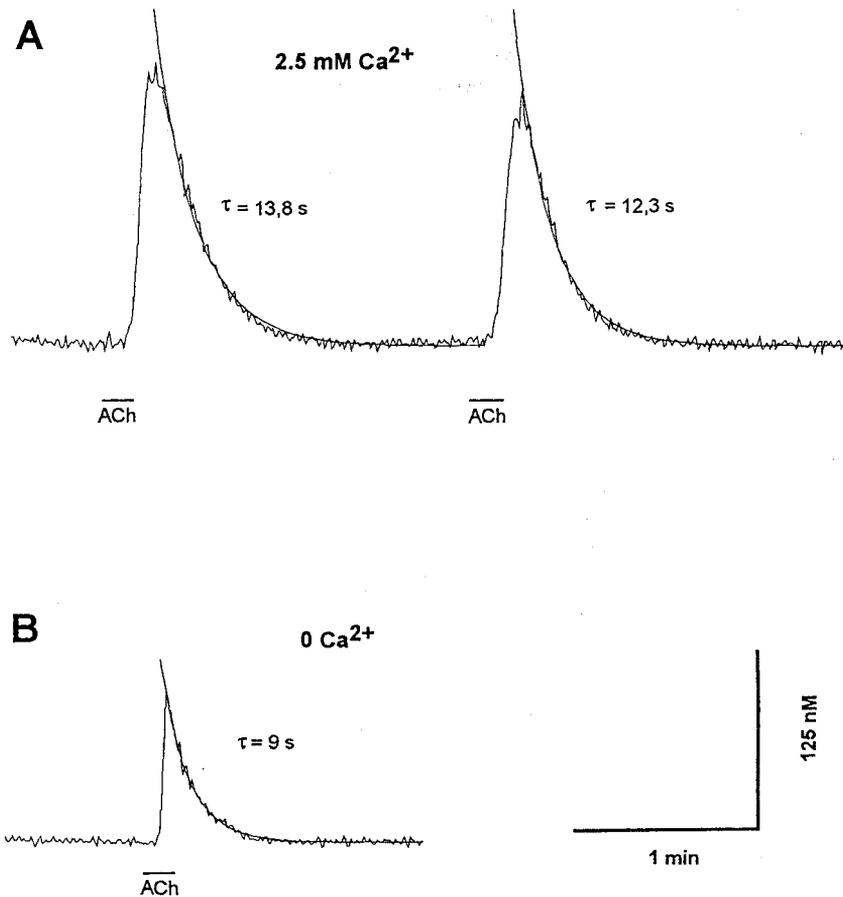


Figura 37. ACh induce $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ con un curso temporal unimodal. **A.** Una primera aplicación de ACh, 20 μM durante 10 s, tras una latencia de ~ 7 s indujo un incremento del Ca^{2+} citosólico de 190 nM con una pendiente de 28 nM/s, que decayó de forma exponencial. Una segunda idéntica aplicación provocó tras una latencia de ~ 7 s un $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 165 nM con una pendiente de 24 nM/s que decreció monotónicamente. **B.** En otra célula, un pulso de ACh, 50 μM durante 10 s, indujo con una latencia de ~ 7 s un $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 110 nM con una pendiente de 63 nM/s y cuyo decremento se ajustó a una función exponencial satisfactoriamente.

3.2.4. Relación [ACh]-[Ca²⁺]_i

La amplitud de la respuesta de Ca²⁺ fue proporcional a la [ACh], como se observa en figura 38. En la parte A de la figura, se representan los Δ[Ca²⁺]_i inducidos en 5 células tras la aplicación de ACh, 2, 20, 50, y 250 μM. Las amplitudes de los transitorios en estas células fueron 10, 285, 350, 440 y 730 nM, respectivamente.

La curva dosis-respuesta se confeccionó con las amplitudes máximas de las señales de Ca²⁺ obtenidas a distintas concentraciones de ACh en un total de 66 células (figura 38, B). El rango de concentraciones en el que se obtuvo respuestas submáximas fue muy amplio, desde 2-250 μM. Se alcanzó la saturación a concentraciones de ACh > 500 μM. Los Δ[Ca²⁺]_i inducidos por ACh alcanzaron un nivel máximo en torno a los 800 nM ([Ca²⁺]_i max). La concentración de ACh con la que se produjo un incremento de la [Ca²⁺]_i mitad del inducido con una [ACh] saturante (K_M), fue de ~ 59 μM de ACh (Figura 38 B). La curva dosis respuesta para la ACh se ajustó satisfactoriamente a una función de Michaelis-Menten.

$$[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i_{max}} \frac{[ACh]}{[ACh] + K_M} \quad (9)$$

La eficacia relativa de los agonistas muscarínicos en inducir aumentos de la [Ca²⁺]_i fue considerablemente mayor que la de los adrenergicos: [ACh] saturantes mediaron incrementos que alcanzaron una [Ca²⁺]_i máxima 4 veces superior a la que mediaron [PE] saturantes (figuras 29 y 38 B).

3.2.5. Cinética de liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares

En solución de 0 Ca²⁺, con o sin 1 mM EGTA, ACh indujo incrementos de la [Ca²⁺]_i con un curso temporal unimodal o multimodal. En las señales de liberación de Ca²⁺ que presentaron dos máximos de [Ca²⁺]_i (Figura 39 A) o una inflexión en la cinética

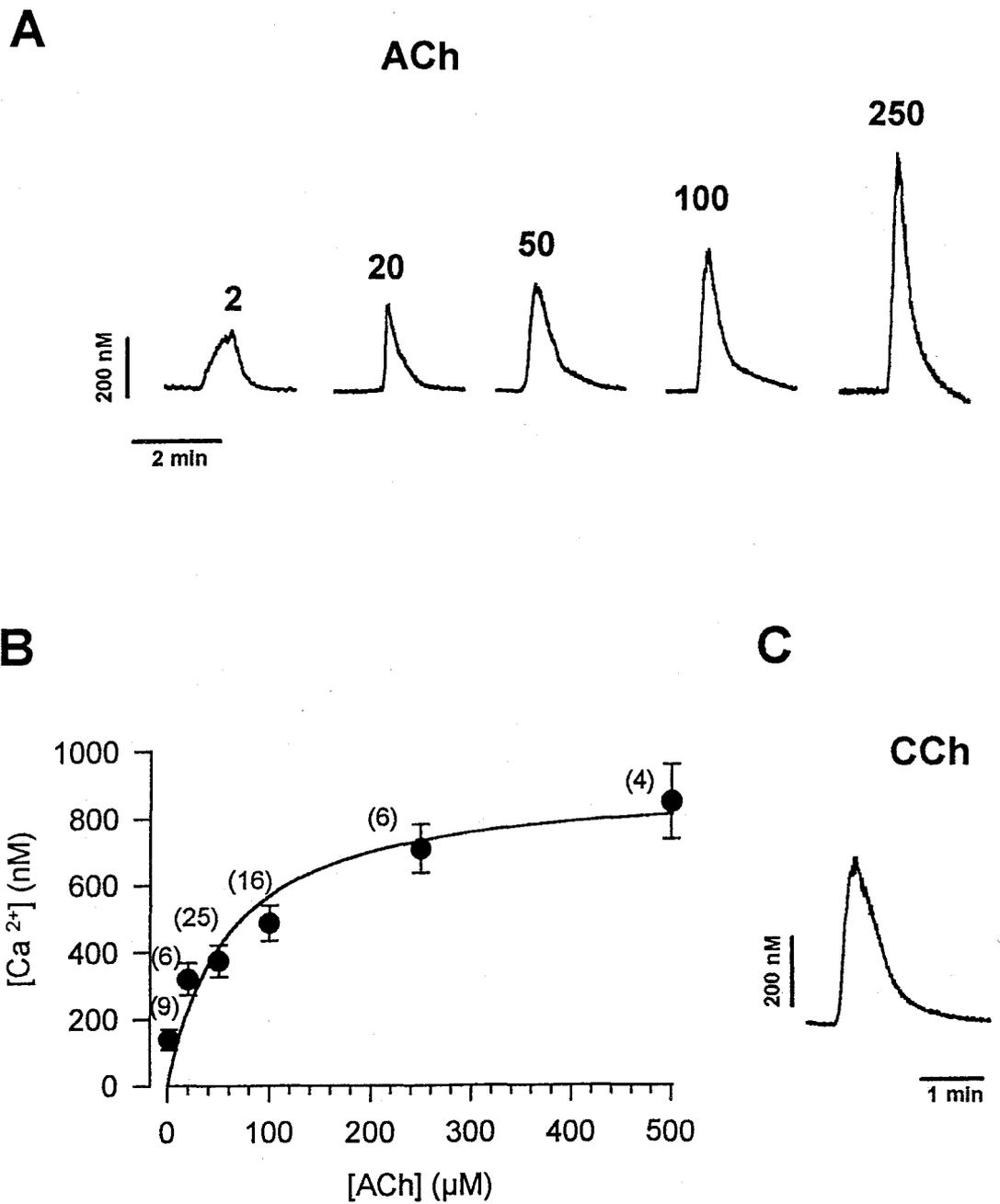


Figura 38. Variación de la amplitud de la señal de Ca^{2+} en función de la concentración de agonistas colinérgicos. **A.** $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ a las concentraciones especificadas (en μM) de ACh en 5 células. **B.** Curva dosis respuesta para ACh en un total de 66 células. Los valores obtenidos se ajustaron a una función de Michaelis-Menten ($[\text{Ca}^{2+}]_{i\text{max}} \sim 800 \text{ nM}$, $K_M \sim 59 \mu\text{M}$). **C.** Incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la aplicación de CCh ($500 \mu\text{M}$) en otra célula.

de decrecimiento de la $[Ca^{2+}]_i$, la substracción del curso exponencial del decaimiento del transitorio de liberación de Ca^{2+} a la señal de Ca^{2+} puso de manifiesto la existencia de más de un evento de liberación de Ca^{2+} (figura 39 B).

Generalmente los transitorios de liberación compuestos estuvieron constituidos por dos eventos de liberación, no obstante, una aplicación de ACh pudo inducir más de dos. En la figura 39 C se ilustra una respuesta de Ca^{2+} inducida por una aplicación de ACh que estuvo constituida por varios eventos de liberación.

De un total de 17 células en las que se indujo señal de liberación de Ca^{2+} con ACh, 50 μ M en solución de 0 Ca^{2+} , en el 59% de los casos (10 células) la liberación fue compuesta y en el resto simple. La amplitud promedio de la señal de Ca^{2+} cuando los transitorios de liberación fueron múltiples fue 238 ± 38 (media \pm e.e.m.), mayor que en aquellos que no, 154 ± 58 . No obstante, esta diferencia observada no tuvo significación estadística (test de la t de Student, $p > 0.22$)

3.3 LIBERACIÓN SELECTIVA DE Ca^{2+} DE ALMACENES INTRACELULARES

3.3.1. Relleno de los almacenes de Ca^{2+} y recuperación de la liberación de Ca^{2+}

Cuando una célula respondió satisfactoriamente a una o más aplicaciones de ACh en solución control, la señal de Ca^{2+} debida a liberación de reservorios intracelulares inducida por ACh, en solución de 0 Ca^{2+} , fue con frecuencia muy pequeña (Figura 40, flechas). Sin embargo, una aplicación subsecuente de NA generalmente indujo una potente respuesta de liberación de Ca^{2+} , la cual también desapareció después de una o más exposiciones a NA (figura 40).

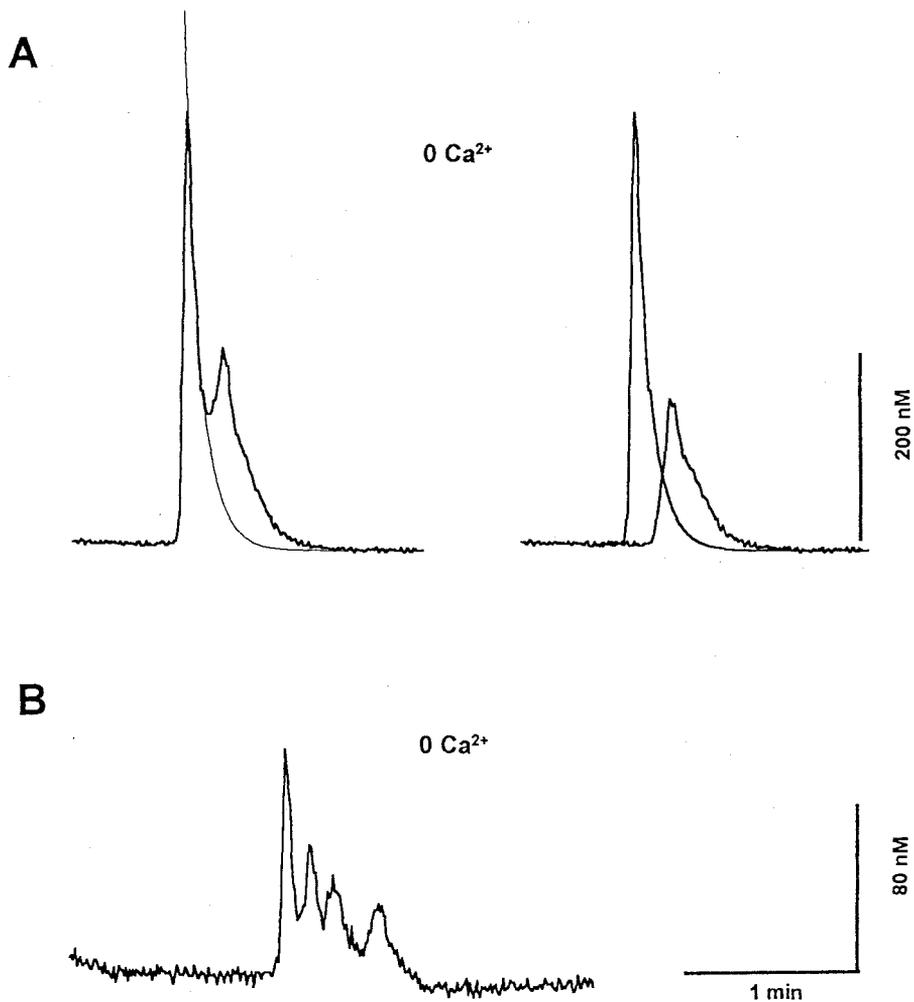


Figura 39. Múltiples eventos de liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares inducidos por ACh ($50 \mu\text{M}$) en ausencia de Ca^{2+} externo. **A.** Transitorio de liberación de Ca^{2+} inducido por una aplicación de ACh, compuesto por dos eventos de liberación. La cinética de liberación del primer evento fue rápida, 59 nM/s , para alcanzar una $[\text{Ca}^{2+}]_{i \text{ max}}$ de $\sim 490 \text{ nM}$ y decaer exponencialmente con una τ de 5.9 s . En el panel de la derecha se muestra la separación de los dos eventos de liberación representados a la izquierda, mediante sustracción al transitorio de Ca^{2+} del curso del decaimiento exponencial del primer evento de liberación. La cinética de liberación del segundo evento fue más lenta, 27 nM/s . El decrecimiento de la segunda señal de Ca^{2+} siguió un curso exponencial con una τ de 9.6 s . **B.** Múltiples liberaciones de Ca^{2+} inducidas por una única aplicación de ACh, $50 \mu\text{M}$ durante 20 s .

Tras retornar a solución extracelular con Ca^{2+} , se registró una señal de Ca^{2+} de gran amplitud, probablemente en respuesta a una señal intracelular liberada por los almacenes vacíos (Putney, 1986; Putney y Bird, 1993; Radriamanpita y Tsien, 1993; Parek, Terlau y Stühmer, 1993). Posteriormente, una aplicación ulterior de agonista en solución de 0 Ca^{2+} , generalmente produjo liberación de Ca^{2+} , siendo suficiente la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular para recuperar la señal de liberación de Ca^{2+} inducida por el agonista.

3.3.2. Vaciamiento no recíproco de los reservorios intracelulares

Para investigar si la liberación de Ca^{2+} resultante de la activación de los receptores muscarínicos es afectada por la liberación previa de Ca^{2+} mediada por receptores α_1 -adrenérgicos, y viceversa, se estudió las características de la liberación de Ca^{2+} en respuesta a múltiple exposiciones de cada agonista. Los experimentos se realizaron en ausencia de Ca^{2+} externo con sucesivas aplicaciones de ACh (o CCh) y NA (o PE).

La Figura 41 A ilustra los transitorios de Ca^{2+} obtenidos en una célula durante tres aplicaciones sucesivas de ACh seguidas por dos pulsos de PE. Las amplitudes de la señal de liberación de Ca^{2+} , en respuesta a pulsos periódicos de ACh, disminuyeron gradualmente. Aplicaciones subsiguientes de PE indujeron nuevos picos de Ca^{2+} los cuales también se extinguieron con estimulaciones repetidas. Después de retornar a solución extracelular con Ca^{2+} , la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentó de forma transitoria. Ulteriormente, una nueva serie de espigas de liberación de Ca^{2+} pudo ser inducida con aplicaciones repetidas de PE, indicando que los almacenes habían sido rellenados. En contraste, cuando después de varios pulsos de PE se aplicó ACh, no se indujo respuesta de liberación de Ca^{2+} o ésta fue muy pequeña (figura 41 A).

Este mismo comportamiento fue observado igualmente en células que no habían

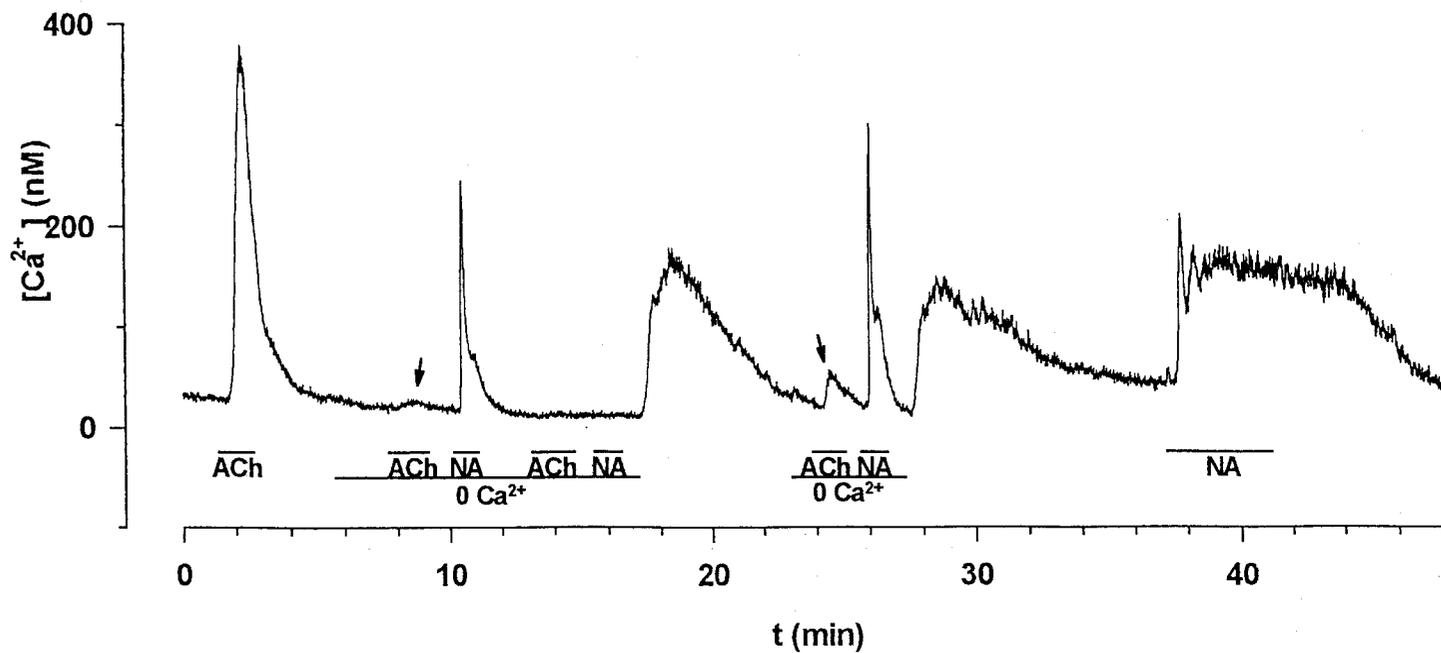


Figura 40. Relleno de reservorios intracelulares de Ca^{2+} y recuperación de la señal de liberación de Ca^{2+} inducida por ACh y NA. La movilización de Ca^{2+} de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares por ACh ($20 \mu\text{M}$) y NA ($4 \mu\text{M}$) tras la depleción de estos fue posible después de una exposición a solución con Ca^{2+} . La señal de liberación de Ca^{2+} inducida por ACh (flechas) fue muy pequeña en comparación con la señal de Ca^{2+} en solución control

sido expuestas a ACh previamente (figura 41 B). En el registro que se muestra en la figura, la célula fue estimulada primero con tres pulsos de PE. Las primeras dos aplicaciones de PE indujeron la liberación de Ca^{2+} almacenado mientras que la tercera no dio respuesta. Una única aplicación posterior de ACh, sin embargo, provocó solamente una pequeña respuesta de la célula. No obstante, después del relleno de los depósitos, ACh pudo inducir repetidamente espigas de liberación de Ca^{2+} demostrando que la vía del receptor muscarínico era todavía operativa. Subsiguientemente, PE indujo una espiga de Ca^{2+} del 40% de la amplitud de la original obtenida con este mismo agonista.

Las amplitudes de las respuestas de liberación de Ca^{2+} , normalizadas con respecto a la amplitud de la primera espiga, con el correspondiente orden de aplicación de cada agonista se representa en las figuras 41 C y D, para 15 células. El gráfico de la parte C ilustra las amplitudes de las señales de Ca^{2+} cuando, consecutivamente a varias aplicaciones de agonista muscarínico, se aplicó un agonista adrenérgico. La extinción de la señal de liberación de calcio no sólo no evitó la respuesta a PE sino que la amplitud de la liberación de Ca^{2+} inducida con PE fue mayor en promedio (131 ± 27.1 %, e.e.m., $n=9$) que la primera con ACh.

La parte D de la figura 41 ilustra las amplitudes medias de las señales de liberación cuando NA (o PE) fue aplicada antes que ACh (o CCh). Como en el primer caso, la liberación de Ca^{2+} mediada por agonistas adrenérgicos progresivamente disminuyó con cada estimulación pero, en contraste a lo que ocurrió cuando inicialmente fueron dadas múltiples aplicaciones colinérgicas, la aplicación subsiguiente de un agonista muscarínico indujo sólo una respuesta muy pequeña, que fue un 15.2 ± 10 % (media \pm e.e.m., $n=6$) de la inducida por el primer pulso de agonista adrenérgico. Así pues, PE podría liberar Ca^{2+} de almacenes intracelulares sensibles a vaciamiento por agonistas muscarínicos, mientras que lo contrario no parece cierto.

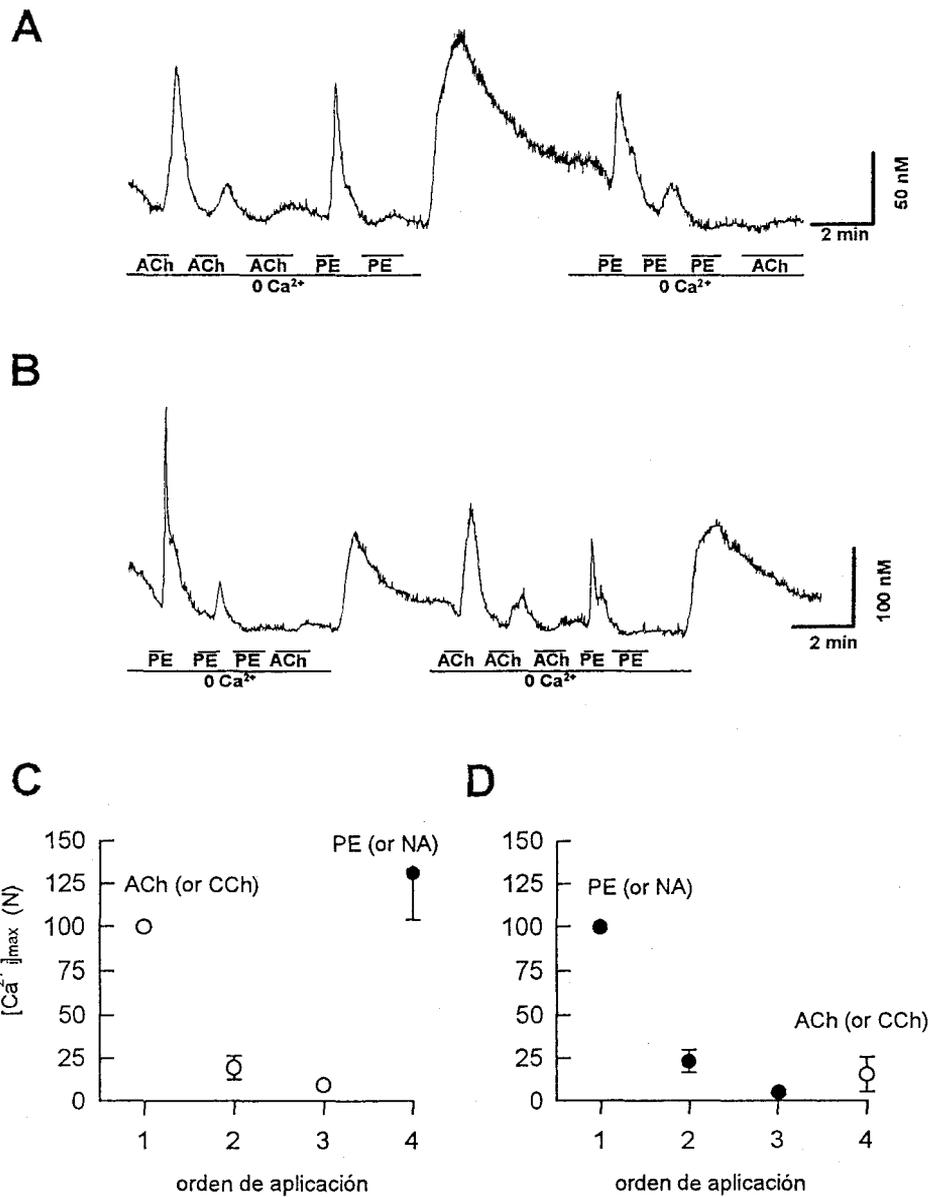


Figura 41. Inhibición no recíproca de la liberación de Ca²⁺ inducida por agonistas muscarínicos y adrenérgicos. **A.** Señal de liberación de Ca²⁺ obtenida en una célula en respuesta a pulsos repetidos de ACh (50 μM) y PE (4 μM). **B.** La secuencia inversa que en A registrada en otra célula. **C.** Amplitudes normalizadas a la amplitud de la espiga de liberación inicial (media ± e.e.m., n=9) en respuesta a sucesivas aplicaciones de ACh (círculos blancos) y PE (círculos negros). **D.** Respuestas de liberación (n=6) normalizadas a la amplitud del primer evento inducidas con sucesivas aplicaciones de PE (círculos negros) seguida de una de ACh (círculo blanco).

3.4. CURSO TEMPORAL DEL DECREMENTO DE LAS SEÑALES DE Ca^{2+}

Dado que estimulaciones sucesivas de PE indujeron señales de Ca^{2+} gradualmente de menor amplitud (Figura 42 A), se investigó el curso temporal del decremento progresivo de la señal de Ca^{2+} . Para estudiar éste fenómeno se siguió un protocolo de estimulación que consistió en aplicaciones de agonista cortas, de igual duración, a intervalos de tiempo regulares.

3.4.1. Estimulaciones sucesivas con PE originan señales de Ca^{2+} progresivamente menores

En la figura 42 A, se muestra el decremento de las amplitudes de los transitorios de Ca^{2+} inducidos en una célula con aplicaciones breves de PE de forma periódica cada 2 minutos.

Para cada célula se normalizaron las amplitudes al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenido tras la primera estimulación. Las amplitudes normalizadas (media \pm e.e.m., $n=5$) se representaron frente al número de orden de su respectiva aplicación (figura 42, B). El decremento de la señal se ajustó a una función exponencial simple cuya constante de decaimiento (τ) expresa el número de aplicaciones necesarias para obtener una señal de Ca^{2+} cuya amplitud fuese un 63.2% menor que la obtenida tras la 1ª aplicación. Con estimulaciones sucesivas de [PE] saturantes (2 y 20 μM), la señal de Ca^{2+} disminuyó gradualmente con una τ comprendida entre 3.45 y 3.99 (Tabla VI).

Resultados

Tabla VI. Constante de decaimiento (τ) de la amplitud de la señal de Ca^{2+} inducidas por distintas concentraciones de agonista en presencia y ausencia de Ca^{2+} externo

| agonista | concentración (μM) | control | τ 0 Ca^{2+} |
|----------|---------------------------------|------------|------------------------------|
| PE | 1 | 5.76 (n=4) | 1.38 (n=4) |
| PE | 2 | 3.45 (n=5) | 1.11 (n=5) |
| PE | 20 | 3.99 (n=4) | 1.18 (n=3) |
| ACh | 50 | 2.73 (n=3) | 0.97 (n=11) |

Como parámetro indicativo del retraso entre la estimulación y el desarrollo de la respuesta, se empleó el tiempo transcurrido desde el inicio de la aplicación hasta que se alcanzó el 50% de la respuesta ($t_{1/2}$). El incremento del $t_{1/2}$ con referencia al $t_{1/2}$ inicial

$$\Delta t_{1/2} = t_{1/2_i} - t_{1/2_0} \quad (10)$$

se representa frente al número de orden de su respectiva aplicación en la figura 42 C (media \pm e.e.m., n=5). Como se observa en la figura, la aparición de la señal de Ca^{2+} no se entorpeció sustancialmente con el número de aplicaciones sucesivas realizadas.

En 0 Ca^{2+} , el curso del decremento de la señal de Ca^{2+} con estimulaciones sucesivas de PE fue más rápido que en control (figura 42 D), y tuvo una τ de decaimiento comprendida entre 1.11 y 1.18, a concentraciones de 2 y 20 μM , respectivamente (Tabla VI, n=8), tres veces más rápida que la obtenida en solución control (figura 42 E).

Así mismo, en ausencia de Ca^{2+} externo el desarrollo de la respuesta fue sucesivamente más lento con cada aplicación de PE. El $t_{1/2}$ se incrementó 3.6 segundos con cada aplicación (figura 42 F).

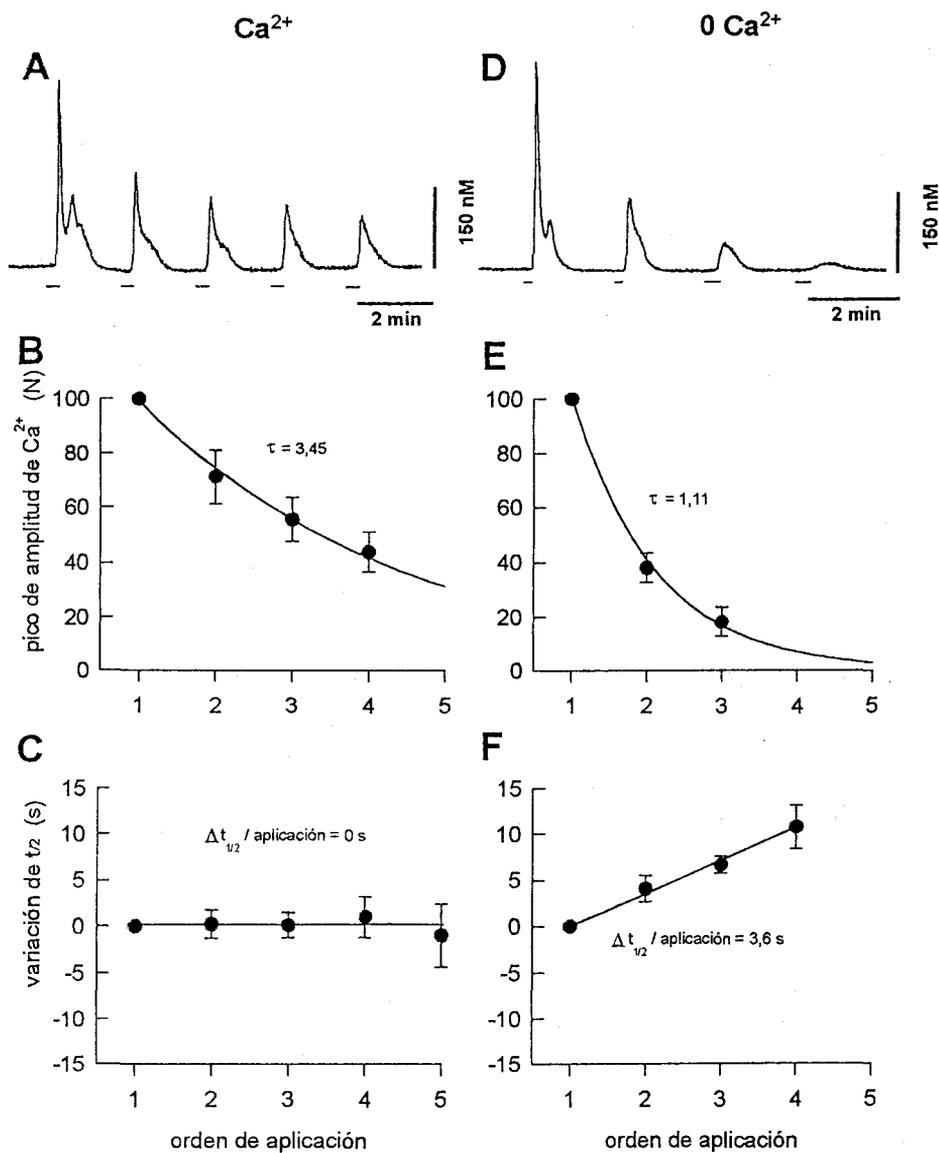


Figura 42. Amplitud de la señal de Ca^{2+} con estimulaciones sucesivas de PE, 2 μM . **A.** Decremento de la señal de Ca^{2+} en solución control, a intervalos de 2 min. **B.** Curso temporal del decremento de la señal de Ca^{2+} normalizada con respecto a la amplitud del primer pico (media \pm e.e.m., $n=5$). **C.** Variación del $t_{1/2}$ con respecto al valor inicial (media \pm e.e.m., $n=5$) en solución control. **D.** Decremento de la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares en otra célula aplicando el mismo protocolo que en A, en solución 0 Ca^{2+} . **E.** Curso temporal del decremento de la liberación de Ca^{2+} (media \pm e.e.m., $n=5$), en solución 0 Ca^{2+} . **F.** En 0 Ca^{2+} , variación del $t_{1/2}$ respecto al valor inicial (media \pm e.e.m., $n=5$).

3.4.2. Estimulaciones sucesivas de ACh disminuyen la amplitud de la señal de Ca^{2+}

La aplicación repetida de ACh produjo una disminución gradual de la amplitud de los transitorios. Para estudiar este decremento de las amplitudes se empleó un protocolo de estimulaciones sucesivas similar al empleado con PE, aplicación periódica de pulsos de ACh de la misma duración (Figura 43).

El curso del decremento con estimulaciones sucesivas de ACh ($50 \mu\text{M}$) se pudo ajustar a una función exponencial simple cuya τ tuvo un valor 2.73 ($n=3$), valor más rápido del observado con estimulaciones repetidas de PE (Tabla VI).

Al igual que con la estimulación repetida con PE, el retraso que se observó entre la aplicación de ACh y el desarrollo del 50% de la señal de Ca^{2+} no se incrementó de modo significativo ($n=3$) con el número de estimulaciones sucesivas realizadas (figura 43).

En solución de 0 Ca^{2+} , sucesivas liberaciones de Ca^{2+} de almacenes intracelulares inducidas con ACh fueron disminuyendo notablemente en amplitud y enlenteciéndose su cinética de activación (figura 43 D)

El curso del decremento de la señal de Ca^{2+} en ausencia de calcio con estimulaciones sucesivas de ACh ($n=11$) se ajustó a una función exponencial decreciente con una τ de 0.97 (figura 43 E), unas tres veces más rápida que la registrada en solución control, aunque similar a la registrada con PE en 0 Ca^{2+} ($n=3$, Tabla VI).

En 0 Ca^{2+} , el enlentecimiento cinético de la liberación de Ca^{2+} con cada estimulación se evidenció en que el $t_{1/2}$ se incrementó unos 5 segundos ($n=11$) con cada aplicación sucesiva de ACh (figura 43 F).

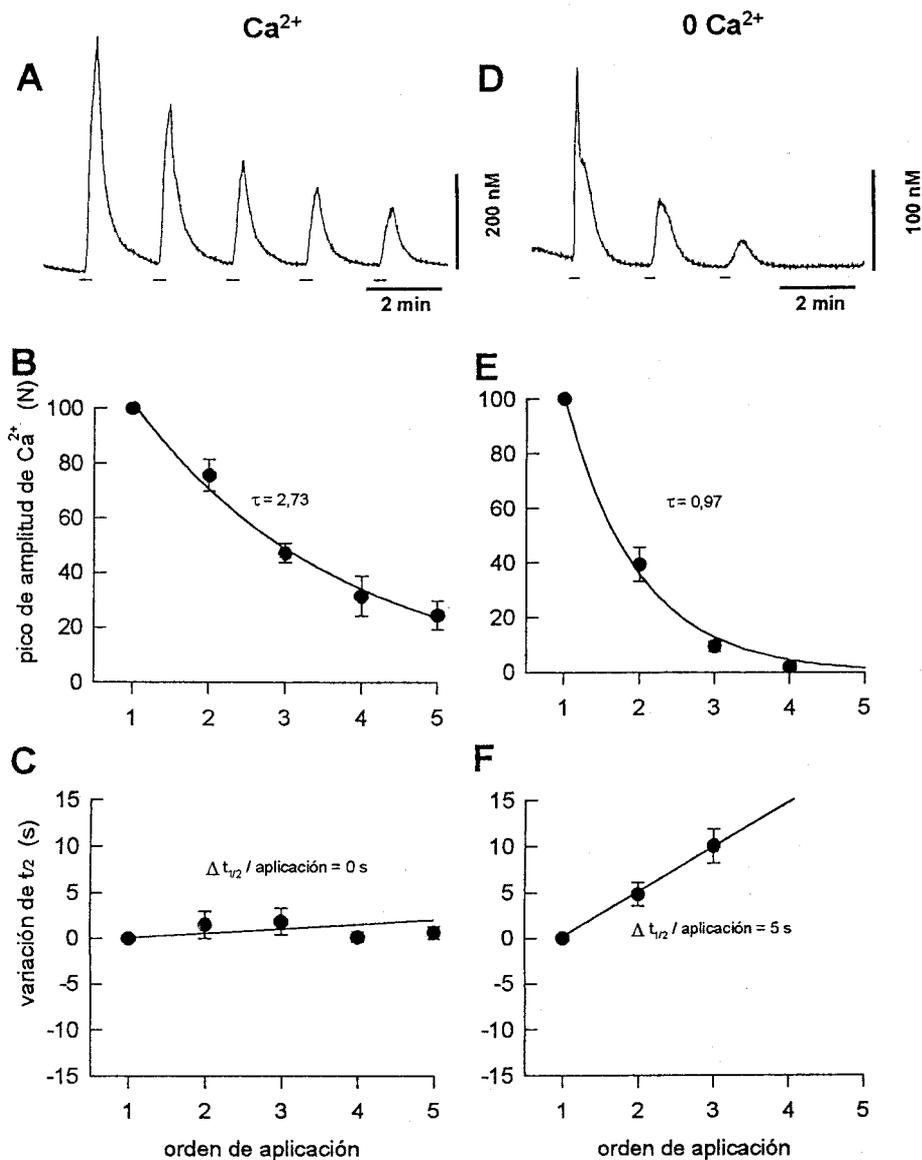


Figura 43. Amplitud de la señal de Ca^{2+} con estimulaciones sucesivas de ACh, $50 \mu\text{M}$, a intervalos de 2 min. A. Decremento de la señal de Ca^{2+} en solución control. B. Curso temporal del decremento de la señal de Ca^{2+} normalizada con respecto a la amplitud del primer pico (media \pm e.e.m., $n=3$). C. Variación del $t_{1/2}$ con respecto al valor inicial (media \pm e.e.m., $n=3$) en solución control. D. Decremento de la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares en otra célula aplicando el mismo protocolo que en A, en solución 0 Ca^{2+} . E. Curso temporal del decremento de la liberación de Ca^{2+} (media \pm e.e.m., $n=11$), en solución 0 Ca^{2+} . F. En 0 Ca^{2+} , variación del $t_{1/2}$ respecto al valor inicial (media \pm e.e.m., $n=11$).

3.4.3. ¿Desensibilización homóloga o vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares?

Para dilucidar si el decremento progresivo de los transitorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por estimulaciones sucesivas de agonista era debido a desensibilización de la respuesta por estimulación repetida o a vaciamiento de los almacenes intracelulares se investigó la recuperación de la señal tras un tiempo de latencia y tras relleno o no de los almacenes de Ca^{2+} .

En solución externa de 0 Ca^{2+} , se aplicó PE a intervalos regulares de 2 min hasta extinguir la señal de Ca^{2+} . Tras una exposición de 4-5 min en solución control (Ca^{2+} , 2.5 mM), de nuevo en ausencia de Ca^{2+} , la célula liberó Ca^{2+} tras una aplicación de PE (Figura 44 A, panel superior). En cambio, células que tras la extinción de la respuesta eran mantenidas en 0 Ca^{2+} no liberaron Ca^{2+} al aplicar PE tras un intervalo de tiempo similar, 6-7 min (figura 44 A, panel inferior).

Tras cambiar la solución de perfusión del baño de 0 Ca^{2+} a control se produjo, de forma sistemática, una elevación generalmente transitoria de los niveles basales de calcio citosólicos.

Resultados similares a los mencionados se obtuvieron con agonistas muscarínicos. Tras la extinción los transitorios de liberación de Ca^{2+} por aplicación de ACh, 50 μM , cada 2 min, y esperar un intervalo mayor (6 min), la aplicación de ACh no fue eficaz en inducir liberación de Ca^{2+} mientras la célula fue mantenida en 0 Ca^{2+} , pero si tras una exposición transitoria en control (figura 44 B).

Las figuras 44 C y D ilustran los promedios de los picos de amplitud de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a aplicaciones de PE y ACh, respectivamente, de varias células que fueron permanentemente mantenidas en 0 Ca^{2+} (círculos) o brevemente expuestas a una solución de calcio dentro del intervalo entre la tercera y la cuarta estimulación (triángulos).

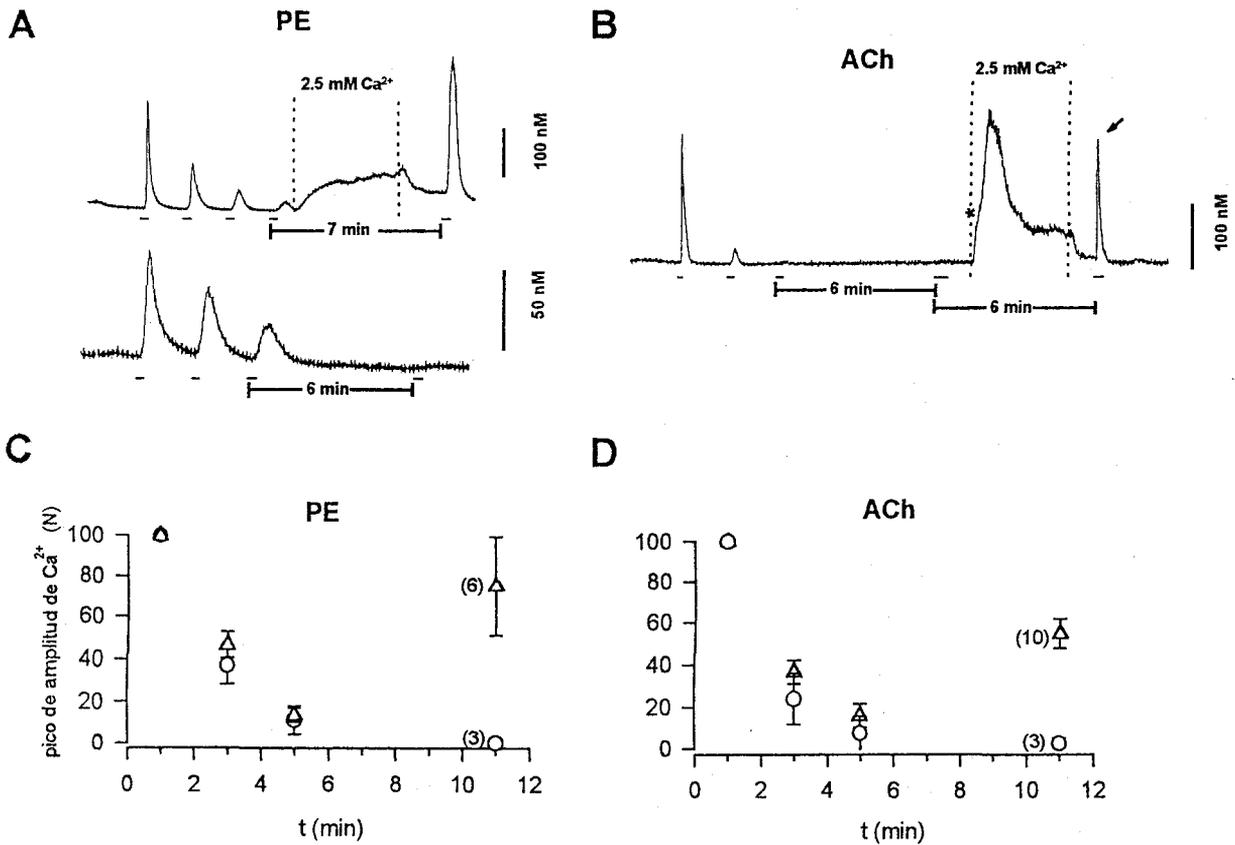


Figura 44. Recuperación de la liberación de Ca^{2+} por relleno de los reservorios de Ca^{2+} . **A.** Registros en una solución de 0 Ca^{2+} en respuesta a sucesivas aplicaciones de PE ($2 \mu\text{M}$). En el experimento ilustrado en el trazo superior, la célula fue expuesta durante 3 min a una solución con Ca^{2+} entre las exposiciones cuarta y última de PE. En el experimento mostrado en el panel inferior, otra célula estuvo mantenida permanentemente en 0 Ca^{2+} durante todas las estimulaciones con PE. **B.** Extinción (asterisco) de la liberación de Ca^{2+} inducida por aplicaciones sucesivas de ACh ($50 \mu\text{M}$) y recuperación (flecha) de la liberación tras el relleno de los depósitos en la misma célula. **C.** Representación gráfica de los picos de amplitud de Ca^{2+} normalizados inducidas por PE con el protocolo descrito en A. Triángulos, células intermitentemente expuestas a Ca^{2+} durante 3-4 min ($n=6$). Círculos, células que fueron continuamente mantenidas en 0 Ca^{2+} ($n=3$). **D.** Igual que en C pero en respuesta a sucesivas aplicaciones de ACh. Círculos células permanentemente mantenidas en 0 Ca^{2+} ($n=3$), triángulos, células expuestas a Ca^{2+} después de la extinción de la respuesta.

Resultados

El valor medio de recuperación de la señal de calcio para un protocolo de estimulación como el descrito (figuras 44 C y D) fue de $75.5 \pm 24\%$ para PE (media \pm e.e.m., $n=6$) y $53.5 \pm 7.7\%$ cuando el agonista empleado fue ACh (media \pm e.e.m., $n=10$).

3.4.4. ¿Desensibilización heteróloga?

La posibilidad de que la ausencia de liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas muscarínicos previa liberación de Ca^{2+} mediada por agonistas α_1 -adrenérgicos se debiese a desensibilización heteróloga de los receptores muscarínicos fue investigada.

En ausencia de Ca^{2+} externo, se empleó el siguiente protocolo de estimulación. Una célula fue primero expuesta a ACh y seguidamente a una ciclo de tres aplicaciones sucesivas de PE antes que se diera un segundo pulso de ACh. En la Figura 45 se ilustra las señales de Ca^{2+} inducidas en una célula con el protocolo mencionado. La amplitud de la respuesta de Ca^{2+} a la segunda estimulación de ACh fue en promedio un $83 \pm 22.4\%$ de la primera respuesta a ACh (media \pm e.e.m., $n=4$). Un valor muy próximo al observado cuando la estimulación adrenérgica no tuvo lugar (ver figura 42 B).

3.4.5. Contenido de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares

Se utilizó el ionóforo ionomicina para examinar el contenido de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Ionomicina puede movilizar Ca^{2+} de almacenes sensibles e insensibles a inositol trifosfato, IP_3 , (Fasolato, Zottini, Clementi, Zacchetti, Meldolesi y Pozzan, 1991). La Figura 46 A ilustra un transitorio de liberación típico inducido por ionomicina ($2 \mu M$) en una célula expuesta en $0 Ca^{2+}$ (solución sin calcio añadido y con $1 mM$ EGTA) durante 1 min.

Para determinar si el contenido en Ca^{2+} de los reservorios intracelulares permanecía constante a lo largo del tiempo en una solución de $0 Ca^{2+}$, se examinó el

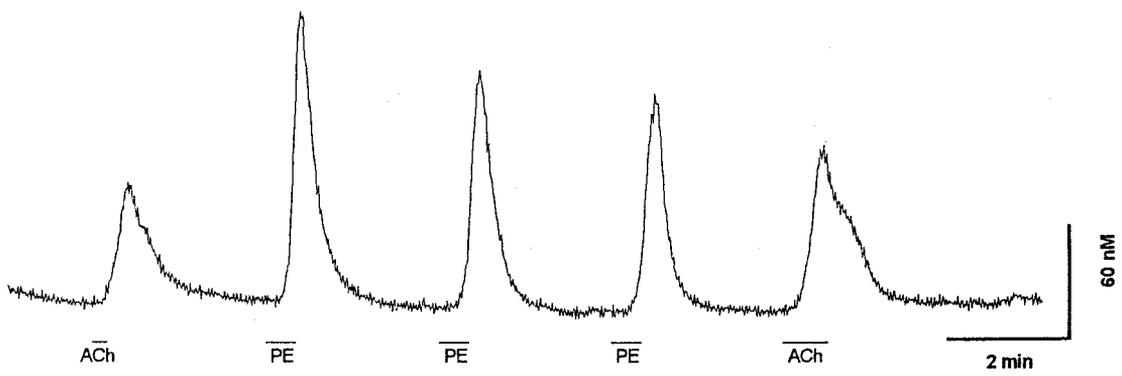


Figura 45. Aplicaciones sucesivas de PE no previnieron el desarrollo de una señal de Ca^{2+} inducida por una aplicación de ACh ulterior. En solución control, dos exposiciones a ACh ($50 \mu\text{M}$), con un ciclo de tres aplicaciones de PE ($2 \mu\text{M}$) entre ambas. La respuesta de Ca^{2+} inducida por la segunda aplicación de ACh fue, en esta célula, un 134% de la primera.

Resultados

contenido de Ca^{2+} de una muestra de células incubadas distintos intervalos de tiempo en solución sin calcio (1, 4, y 7 min). La representación gráfica de las amplitudes pico de Ca^{2+} (media \pm e.e.m., n=17) frente al tiempo de exposición en 0 Ca^{2+} (figura 46 C) sugiere una relación directa entre el tiempo de exposición a 0 Ca^{2+} y el decremento del contenido intracelular de Ca^{2+} , más evidente para tiempos de incubación más largos (no se muestra). Así pues, las células expuestas a solución de 0 Ca^{2+} experimentaron un vaciamiento pasivo de sus reservorios de Ca^{2+} .

Se examinó con ionomicina, el contenido de Ca^{2+} en los reservorios tras la estimulación repetida con el agonista, y se comparó con el existente en células sin estimulación previa. Dado que en 0 Ca^{2+} las células experimentan vaciamiento pasivo, se expusieron el mismo tiempo en 0 Ca^{2+} los dos grupos de células. La amplitud pico de Ca^{2+} en respuesta a ionomicina (2 μM) fue, en células estimuladas previamente con el agonista, un 34 \pm 8.9% de la amplitud registrada en células no estimuladas (figura 46 C).

3.4.6. Estimulaciones supramáximas muscarínicas no vacían el reservorio de Ca^{2+} asociado a estimulación adrenérgica

Para investigar si PE podría todavía liberar Ca^{2+} de su reservorio asociado tras una estimulación supramáxima de los receptores muscarínicos, se realizaron experimentos (n=3) con concentraciones saturantes de ACh o CCh (1 mM) y PE (4 μM). PE indujo liberación de Ca^{2+} después de la inducida por concentraciones saturantes muscarínicas (Figura 47 A) mientras que ni la aplicación de ACh ni CCh, después de una liberación mediada por PE indujo señal de Ca^{2+} . En la parte B de la figura 47, se ilustra la extinción de la liberación de Ca^{2+} inducida por dosis muy altas de CCh, sugiriendo que los almacenes de Ca^{2+} sensibles a estimulación muscarínica estaban vacíos (flecha). No obstante, una aplicación ulterior de PE fue eficaz en inducir liberación de Ca^{2+} de

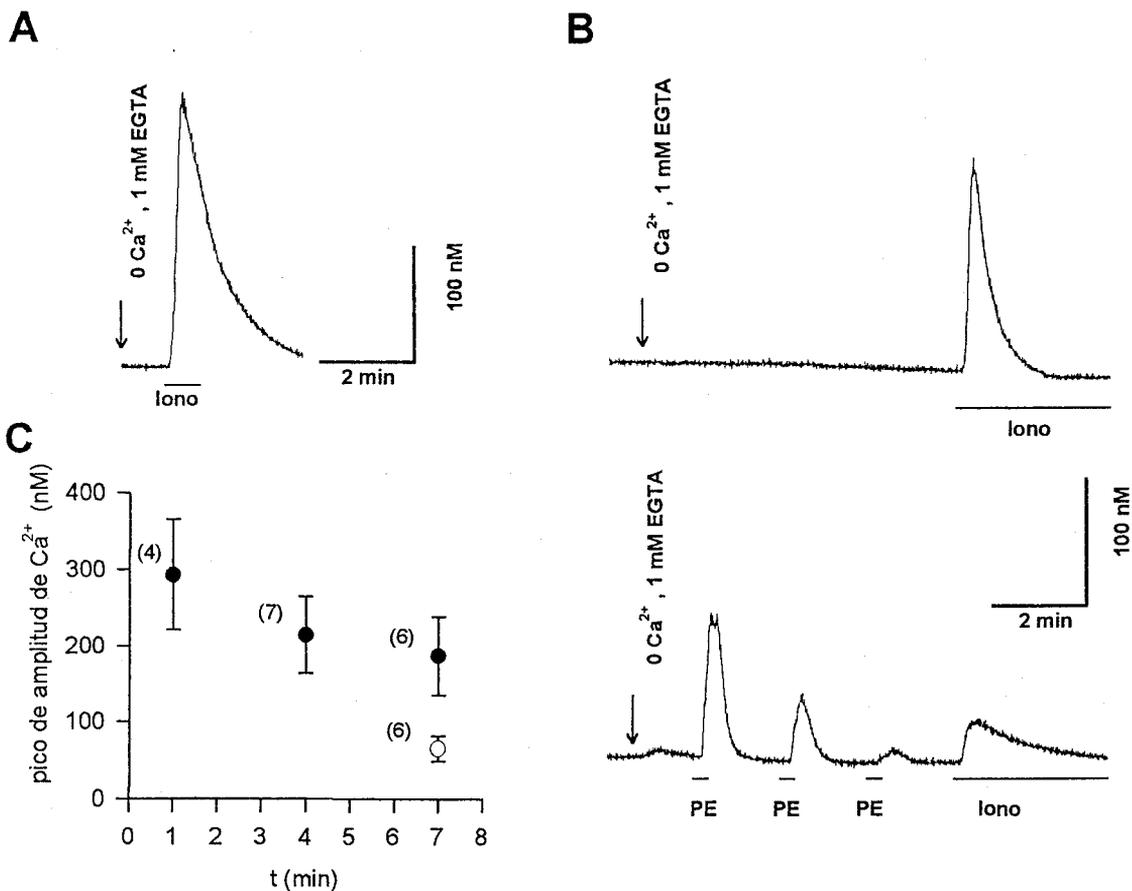


Figura 46. Características del vaciamiento de almacenes de Ca²⁺ intracelulares. **A.** Transitorio de Ca²⁺ inducido por la adición de ionomicina, 2 μ M, a la solución externa en una célula después de 1 min expuesta a solución de 0 Ca²⁺ nominal. **B.** Aplicación de ionomicina tras 7 min en solución extracelular sin Ca²⁺ en dos células diferentes. En el panel superior, la célula no fue previamente estimulada, mientras que en el panel inferior la célula fue estimulada tres veces con PE (2 μ M) para inducir liberación de Ca²⁺ intracelular antes de la aplicación de ionomicina. **C.** Amplitudes de los transitorios de Ca²⁺ (media \pm e.m.) obtenidos en 23 células por la aplicación de ionomicina (2 μ M) tras uno, cuatro o siete min en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Los círculos negros son de células que no fueron estimuladas con agonista, los círculos blancos son de células que fueron estimuladas con PE antes de aplicar ionomicina.

Resultados

reservorios intracelulares.

La pérdida de respuesta a los agonistas muscarínicos después de la liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas α_1 -adrenérgicos no pudo ser atribuida a vaciamiento pasivo en 0 Ca^{2+} porque cuando se aplicó CCh a una célula expuesta en solución de 0 Ca^{2+} un tiempo similar al empleado cuando se estimuló con PE previamente (hasta ~ 5 min) se indujo señal de liberación de Ca^{2+} .

3.5. ¿DOS RESERVORIOS INTRACELULARES DISTINTOS?

3.5.1. Las señales de Ca^{2+} son insensibles a PTX

La incubación de las células con toxina *pertussis* (PTX), 140-280 ng/ml durante 16-18 horas, no previno que PE o ACh indujeran señales de Ca^{2+} de características similares a las registradas en ausencia de la toxina, tanto en solución control como en solución de 0 Ca^{2+} (n=13). Este resultado sugiere que los receptores que median el desarrollo de la respuesta, tanto adrenérgicos como muscarínicos, están acoplados a proteínas G insensibles a PTX.

3.5.2. La liberación de Ca^{2+} intracelular no es sensible a cafeína

En 0 Ca^{2+} , la aplicación de cafeína a un total de 7 células, 10 mM (n=6) o 50 μM (n=1), no produjo ningún incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por otro lado, la aplicación de NA (o PE), ACh (o CCh) indujeron liberación de Ca^{2+} después de la aplicación de cafeína (Figura 48 A y B, respectivamente). Esto sugiere que en células pineales la liberación de Ca^{2+} no procede, al menos de forma significativa, de almacenes de Ca^{2+} sensibles a cafeína.

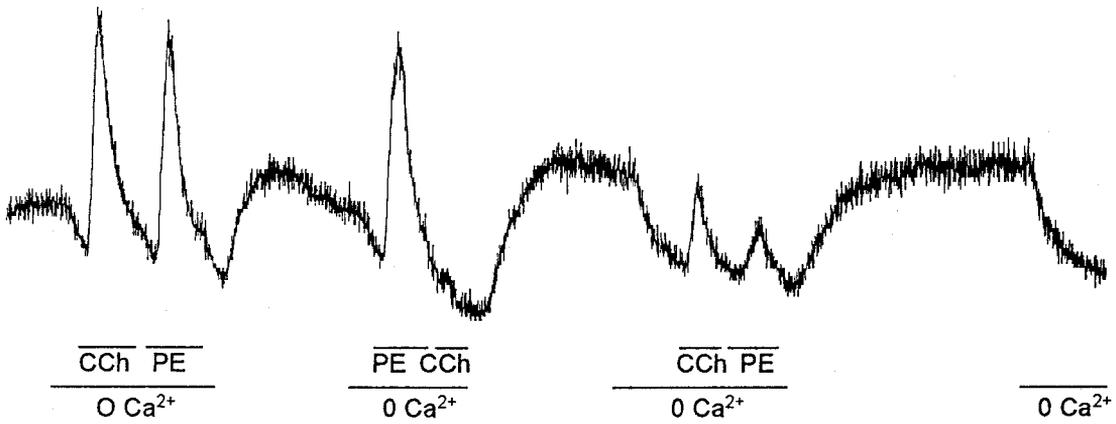
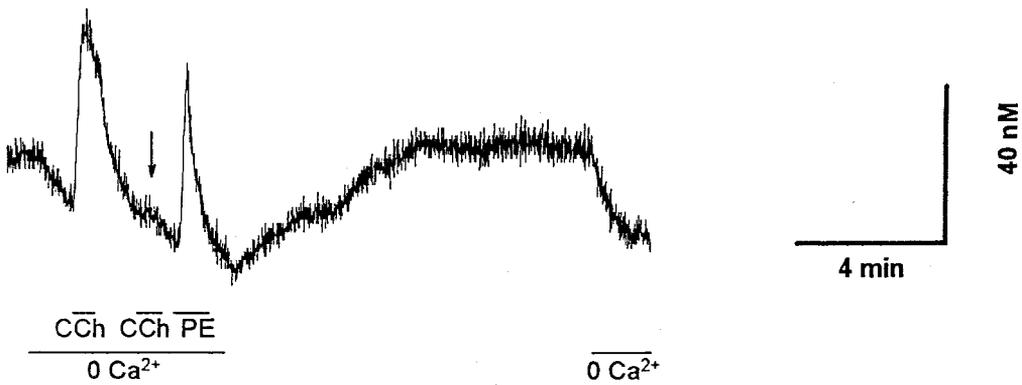
A**B**

Figura 47. Estimulación muscarínica supramáxima no depletó los reservorios sensibles a PE. **A.** Señal de liberación de Ca²⁺ en respuesta a aplicación de 1 mM CCh y 4 μM PE. **B.** En otra célula de la misma preparación, registro donde se realizan dos aplicaciones consecutivas de CCh (1 mM) seguidas de una de PE

Resultados

Al contrario de lo que ocurre en otras preparaciones celulares, la cafeína no inhibió la movilización de Ca^{2+} dependiente de los agonistas externos (Parker e Ivorra, 1991; Missiaen, Taylor y Berridge, 1992).

3.5.3. No efecto de tapsigargina

La tapsigargina es una droga que moviliza Ca^{2+} citosólico por tres mecanismos conocidos: disminución de la recaptación del Ca^{2+} por inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa del tipo SERCA (del inglés "Smooth endoplasmic Reticulum Calcium ATPase"), liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, y entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Kwan et al, 1990).

La aplicación de tapsigargina, 8, 16, 58 nM y 1 μM no tuvo efecto en modificar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólica ni prevenir la liberación de Ca^{2+} inducida por una aplicación ulterior de agonistas muscarínicos ni en 0 Ca^{2+} ($n=7$) ni en control ($n=2$). No obstante, concentraciones mayores de tapsigargina, 5 μM , indujeron pequeñas señales de Ca^{2+} intracelular ($n=4$), pero no inhibieron la liberación de Ca^{2+} inducida por una aplicación subsiguiente de CCh (figura 48 C).

3.6 BLOQUEO DE LA ENTRADA DE Ca^{2+}

La despolarización de las células pineales indujo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la entrada de este catión desde el medio externo. Un cambio transitorio de la perfusión con una solución de bajo K^+ (2.7 mM) a una de alto K^+ (50-60 mM) indujo un $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ en 13 de 15 células expuestas. El incremento de Ca^{2+} citosólico inducido con alto K^+ fue, sin embargo, completamente inhibido (>99.5%) con la presencia de Ni^{2+} en el medio, 1-5 mM, ($n=5$).

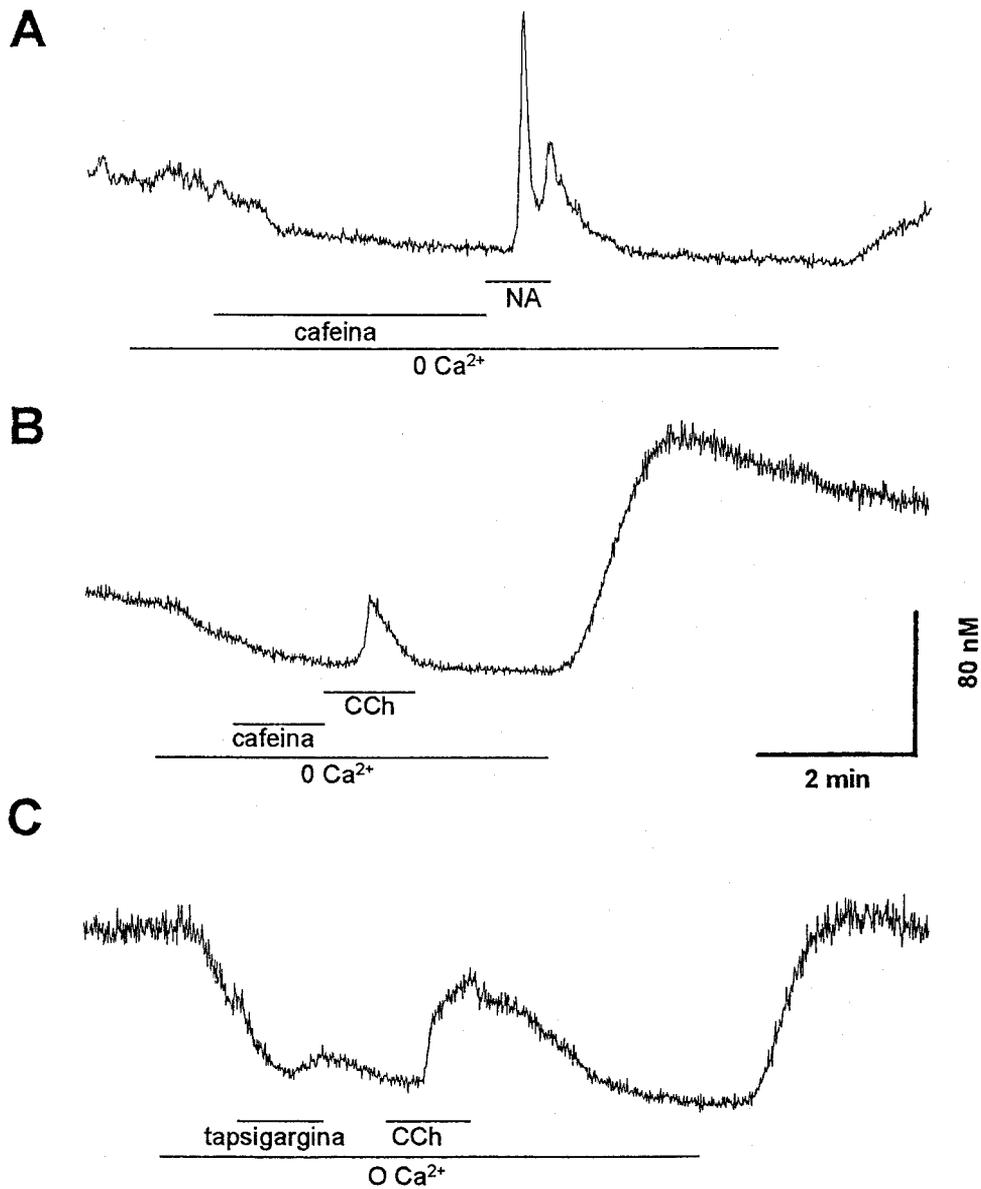


Figura 48. Efecto de cafeina y tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_i$. **A.** Cafeina, 10 mM, no indujo incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, ni inhibió la liberación de Ca^{2+} mediada por NA (4 μ M). **B.** Cafeina, 10 mM, no evitó la liberación de Ca^{2+} inducida por CCh, 1 mM. **C.** Tapsigargina a altas concentraciones, 5 μ M, indujo pequeños incrementos de $[Ca^{2+}]_i$, pero no previno la señal de Ca^{2+} mediada por una aplicación subsiguiente de CCh, 1 mM.

Resultados

La Figura 49 muestra las fluctuaciones del Ca^{2+} intracelular obtenidas en una célula expuesta a diferentes estímulos externos. NA, 2 μM , indujo una respuesta de Ca^{2+} característica que consistió en una espiga seguida de una meseta, como se describió antes. Una exposición a una solución de K^+ , 60 mM, en presencia de Ni^{2+} , 1 mM, no tuvo efecto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mientras que la exposición a alto K^+ sólo dio lugar tanto a oscilaciones del Ca^{2+} citosólico como transitorios aislados con decaimiento monotónico.

La presencia de Ni^{2+} en el medio extracelular bloqueó la entrada de Ca^{2+} en la célula no sólo a través de canales dependientes de voltaje (figura 49) sino también a través de aquellos regulados por agonista.

En la Figura 50 A, se ilustra que la exposición de la célula a Ni^{2+} , 5 mM, durante la fase de meseta de un transitorio inducido por NA acortó la duración de la misma. Sin embargo, no previno la liberación de Ca^{2+} (espiga). El cambio a una solución libre de Ni^{2+} produjo una elevación del Ca^{2+} citosólico similar a la observada cuando se pasa de solución de 0 Ca^{2+} a una de control, probablemente en respuesta a la deplección de los reservorios intracelulares (señal de relleno). El retorno a una solución con Ni^{2+} durante esta respuesta de Ca^{2+} , bloqueó la entrada de Ca^{2+} externo, abortando la señal de relleno. El bloqueo ejercido por Ni^{2+} fue reversible, su retirada del medio externo permitió que un pulso ulterior de NA indujese un transitorio similar al inducido por la primera aplicación de NA.

La presencia de La^{3+} en el medio extracelular también bloqueó la entrada de Ca^{2+} externo a través de canales regulados por agonista. En la figura 50 B se ilustra que la exposición a una solución con La^{3+} , 100-400 μM , durante la fase de meseta del transitorio inducido por NA, bloqueó la entrada de Ca^{2+} durante la misma.

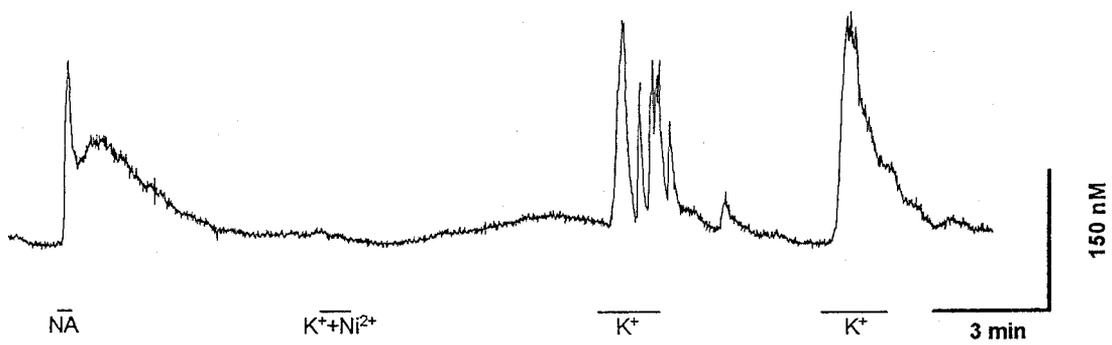


Figura 49. Entrada de Ca^{2+} través de canales dependientes de voltaje que es bloqueada con Ni^{2+} . Aplicación de NA ($2 \mu\text{M}$), K^+ (60 mM) + Ni^{2+} (1 mM) y K^+ . La depolarización provocada por una solución de alto potasio induce $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$.

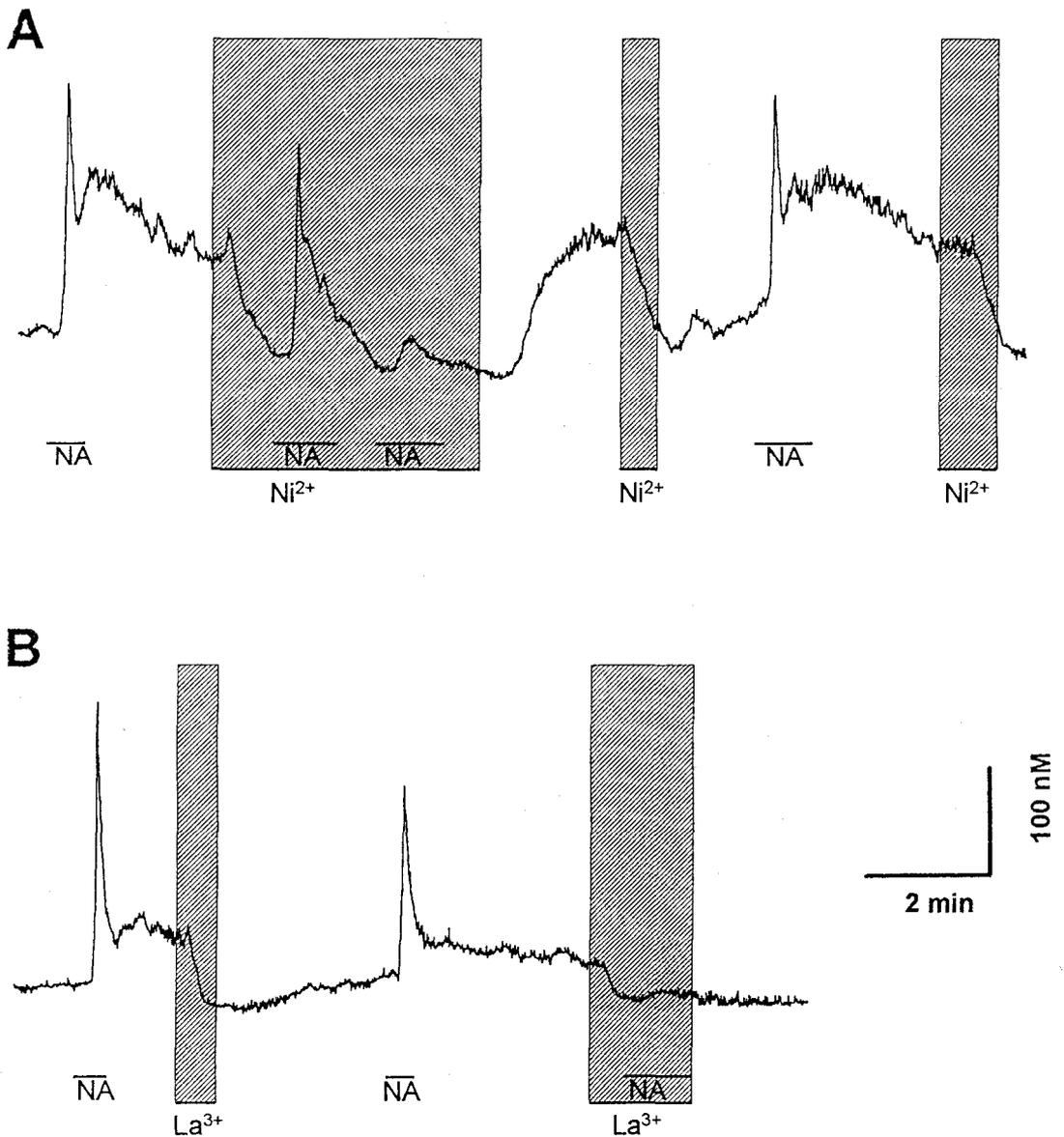


Figura 51. Efecto de Ni^{2+} y La^{3+} sobre la $[\text{Ca}^{2+}]$. **A.** La presencia de Ni^{2+} en el medio extracelular, 5 mM, bloqueó reversiblemente el componente extracelular del transitorio de Ca^{2+} inducido por NA, 4 μM , y la entrada de Ca^{2+} externo durante la señal de Ca^{2+} de relleno de almacenes intracelulares. **B.** La^{3+} en la solución extracelular, 400 nM, también bloqueó reversiblemente la entrada de Ca^{2+} durante la fase de meseta del transitorio de Ca^{2+} inducido por NA. La tercera aplicación de NA, en presencia de La^{3+} , falló en inducir incremento del Ca^{2+} citosólico

3.7 OSCILACIONES ESPONTANEAS DEL Ca^{2+} CITOSÓLICO

En ausencia de estimulación algunas células desarrollaron incrementos transitorios y sucesivos de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Generalmente las oscilaciones estuvieron constituidas por eventos únicos de Ca^{2+} que se sucedieron con intervalos de 5-20 s entre si, produciéndose sumación temporal de los mismos. Así, las oscilaciones se sucedieron en salvas de eventos únicos de Ca^{2+} , siendo habitualmente, el primero de los eventos el de mayor amplitud, y decreciendo sucesivamente la amplitud con cada nuevo transitorio.

Los eventos de Ca^{2+} que constituían las oscilaciones espontaneas tuvieron una cinética de activación rápida (30-90 nM/s) y decayeron con un curso monotónico, recordando en todo al curso temporal de los eventos de liberación múltiples inducidos por agonista. En el panel superior de la Figura 51 se ilustra una célula que produjo espontáneamente cambios transitorios y sucesivos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y en la que la exposición a una solución de 0 Ca^{2+} eliminó las oscilaciones del Ca^{2+} citosólico. En el panel inferior se muestra el amortiguamiento de las oscilaciones espontaneas en otra célula.

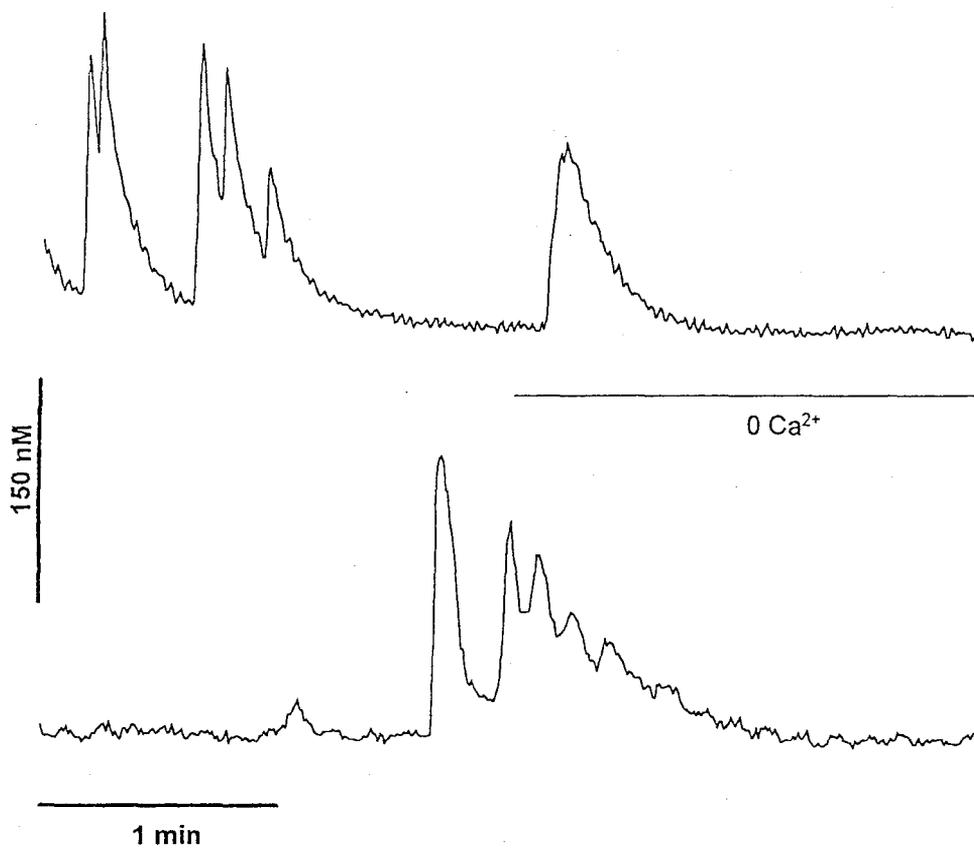


Figura 51. Oscilaciones espontaneas del Ca^{2+} . Se representan cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, registrados en dos células (panel superior e inferior, respectivamente) en ausencia de aplicación de agonista.

**RESULTADOS,
CORRIENTES IÓNICAS
Y POTENCIAL DE
MEMBRANA**

4.1. CORRIENTES IÓNICAS

En el presente apartado se describen los resultados del estudio de las corrientes macroscópicas dependientes de voltaje y activadas por segundo mensajero en pinealocitos de rata, registradas en *configuración de célula completa* de la técnica de "patch-clamp".

4.1.1. Canales activados por voltaje

4.1.1.1. *Canales de Ca²⁺ activados por voltaje*

En presencia de 2.5 mM Ca²⁺ en la solución externa, se registró una corriente hacia el interior celular dependiente del potencial de membrana y de muy pequeña amplitud (<50 pA). No obstante, cuando se eliminó el Ca²⁺ de la solución extracelular (no Ca²⁺ añadido + 1 mM EGTA), la aplicación de pulsos despolarizantes dio lugar a la

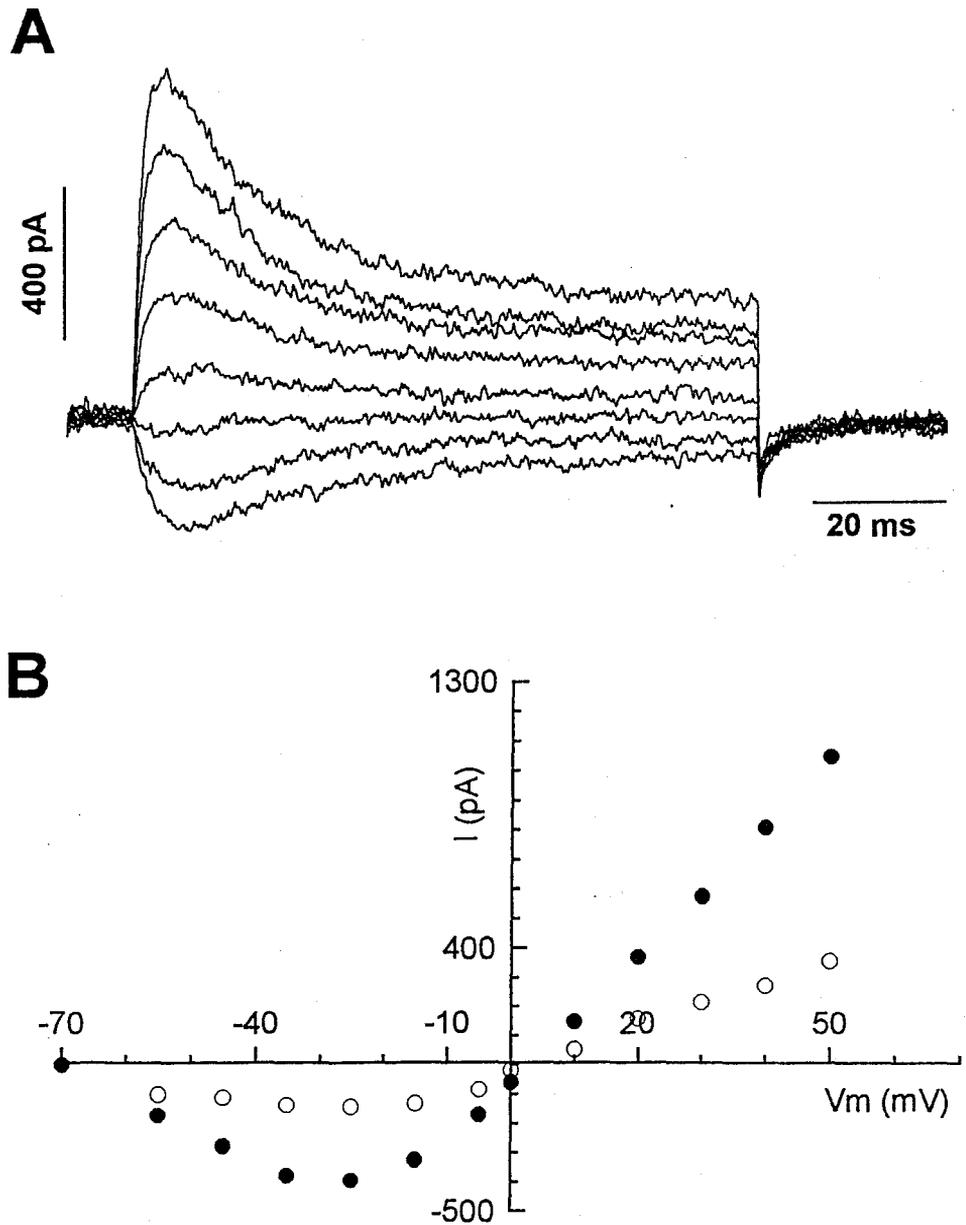


Figura 52. Corriente de Na^+ a través de canales de Ca^{2+} . **A.** Registro de corrientes activadas por pulsos despolarizantes de 100 ms que, desde un potencial de membrana de -80 mV, fueron a voltajes que variaron entre -45 y -15 mV. La solución interna tuvo (en mM): 145 ClNa, 1 EGTA y 10 HEPES. La solución externa tuvo (en mM): 115 Glutamato-Na, 30 ClNa, 1 EGTA, 10 HEPES. **B.** Relación corriente-voltaje obtenida de registros de la misma célula que en A. Los trazos de corriente fueron medidos a nivel de su máxima amplitud (círculos negros) y cuando ésta fue estacionaria (círculos blancos).

activación de corrientes de Na^+ . Estas corrientes sólo pudieron ser registradas en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo que sugería que el Na^+ cruzaba la membrana a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje. Los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial de membrana son más permeables a Na^+ que a Ca^{2+} en ausencia de cationes divalentes en el medio externo (Almers y McCleskey, 1984; Hess y Tsien, 1984). En la Figura 52 A se muestra una familia de trazos de corrientes registradas en la configuración de célula completa, en soluciones simétricas de Na^+ y EGTA, a diferentes potenciales de membrana.

Desde un potencial de membrana impuesto de -80 mV, la corriente empezó a activarse a potenciales más despolarizados de -55 mV y fue *hacia dentro* con potenciales impuestos negativos y *hacia fuera* a potenciales de membrana positivos (ver figura 52). La corriente alcanzó un valor máximo en milisegundos, para después inactivarse lentamente.

En la figura 52 B se muestra la relación corriente-voltaje del experimento mostrado en A. La curva I-V fue prácticamente lineal desde -15 a +50 mV. El potencial de reversión de la corriente fue próximo a 0 mV, tanto cuando ésta fue medida en su amplitud máxima (círculos negros) como en estado estacionario (círculos abiertos).

En las condiciones experimentales empleadas ($E_{\text{Cl}} = -40$ mV), las corrientes registradas sólo podían ser de Na^+ . Además, no se encontró evidencia de la existencia de canales de Na^+ activados por potencial, en concordancia con trabajos previos en células pineales (Aguayo y Weight, 1988; Castellano, López Barneo y Armstrong, 1989).

La presencia de canales de Ca^{2+} activados por voltaje en células pineales ha sido descrita previamente (Aguayo y Weight, 1988). El umbral de activación y la cinética de esta corriente fueron muy similares a los de la corriente a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje *de bajo umbral (tipo T)*, de otras células. Por ejemplo, en la célula de la Figura 53, la constante de tiempo de desactivación a un potencial impuesto de -80

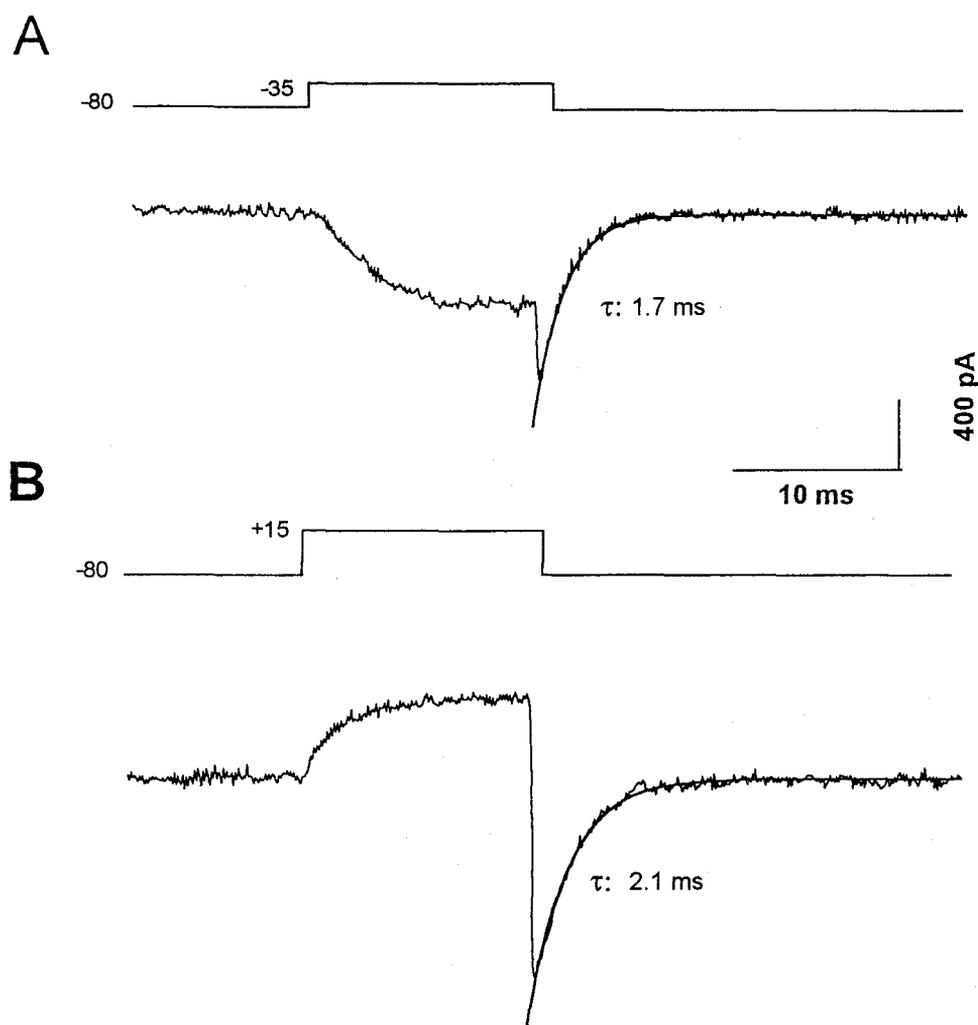


Figura 53. Características cinéticas de los canales de Ca^{2+} . Dos registros de corriente de Na^+ a través de canales de Ca^{2+} inducida con pulsos despolarizantes de 14 ms. La solución interna tuvo (en mM): 145 ClNa, 1 EGTA y 10 Hepes. La solución interna tuvo (en mM): 115 Glutamato-Na, 30 ClNa, 1 EGTA, 10 Hepes. El umbral de activación estuvo por debajo de -35 mV. La corriente de desactivación fue satisfactoriamente ajustada a una exponencial simple con una constante de tiempo indicada en la figura.

mV fue 1.7 y 2.1 ms para el experimento ilustrado en A y B, respectivamente, valores muy similares a aquellos obtenidos para canales de Ca^{2+} de *desactivación lenta (tipo T)* en otros tipos celulares.

4.1.1.2. *Corrientes de potasio activadas por voltaje*

Las células pineales, como ha sido descrito previamente (Castellano, López-Bameo y Armstrong, 1989; Aguayo y Weight, 1988), poseen dos tipos de corrientes de K^+ con características cinéticas muy distintas. En la Figura 54 A y B, se muestran corrientes de K^+ registradas en configuración de célula completa en dos células a las que se aplicaron distintos pulsos de voltaje desde un potencial de membrana de -60 mV. Las corrientes emplearon entre 30 y 40 ms en alcanzar su máximo, y desde aquí se inactivaron menos de un 5% en pulsos de 100 ms de duración. El umbral de activación fue ~ -20 mV. Por sus características cinéticas, estas corrientes de K^+ se corresponden con el tipo denominado *rectificador tardío* (I_{DR}).

Los trazos de corrientes mostrados en la figura 54 C fueron registradas en la misma célula que en B aplicando pulsos de voltaje desde un potencial de membrana de -90 mV. A este potencial se hizo evidente un componente de la corriente que se activó a un umbral más negativo, cercano a -40 mV, que alcanzó el máximo con mayor rapidez, menos de 4 ms, y que se inactivó manifiestamente en pulsos de 100 ms de duración. Este componente de la corriente de K^+ rápida y transitoria se corresponde con la llamada I_{A} .

Ambos tipos de corrientes (I_{DR} e I_{A}) fueron disociados como se muestra en la Figura 55. Una despolarización de 100 ms desde un potencial de membrana de -90 mV hasta 0 mV activó una corriente con un curso temporal complejo (A). Cuando el pulso de voltaje se repitió desde un potencial de -60 mV la corriente registrada fue fundamentalmente I_{DR} (B). En la parte C de la figura se muestra el resultado de sustraer

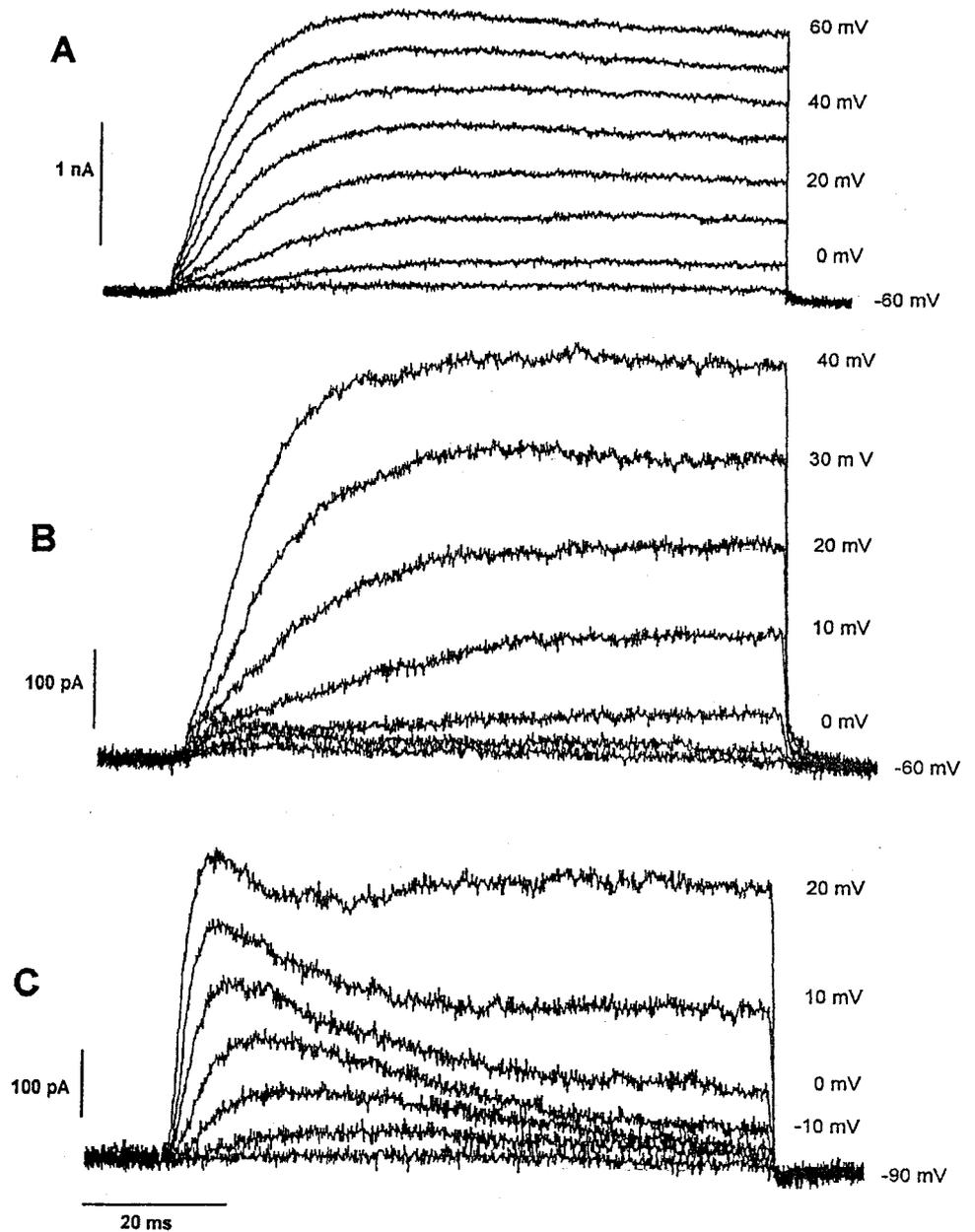


Figura 54. Corrientes de potasio en células pineales. **A.** Registros de corrientes de potasio tipo I_{DR} activadas con pulsos de voltaje de 100 ms que desde un potencial de membrana de -60 mV fueron de -10 a +60 mV, a incrementos de 10 mV. **B.** En otra célula, registros de corrientes de potasio del tipo I_{DR} (parche perforado con nistatina, 250 $\mu\text{g/ml}$), activadas desde un potencial de membrana de -60 mV con pulsos que fueron de -20 a +40 mV, a incrementos de 10 mV. **C.** Registros de la misma célula que en B. Desde un potencial de membrana de -90 mV, los pulsos variaron de -40 a +20 mV, a incrementos de 10 mV. Apareció en la corriente un componente tipo I_A . La solución externa (en mM): 140 ClNa, 10 Cl₂Ca, 10 Hepes, 30 glucosa. La solución interna (en mM): 140 ClK, 7 Cl₂Mg, 0.35 EGTA-K₂, 0.225 EGTA-Ca, 10 Hepes.

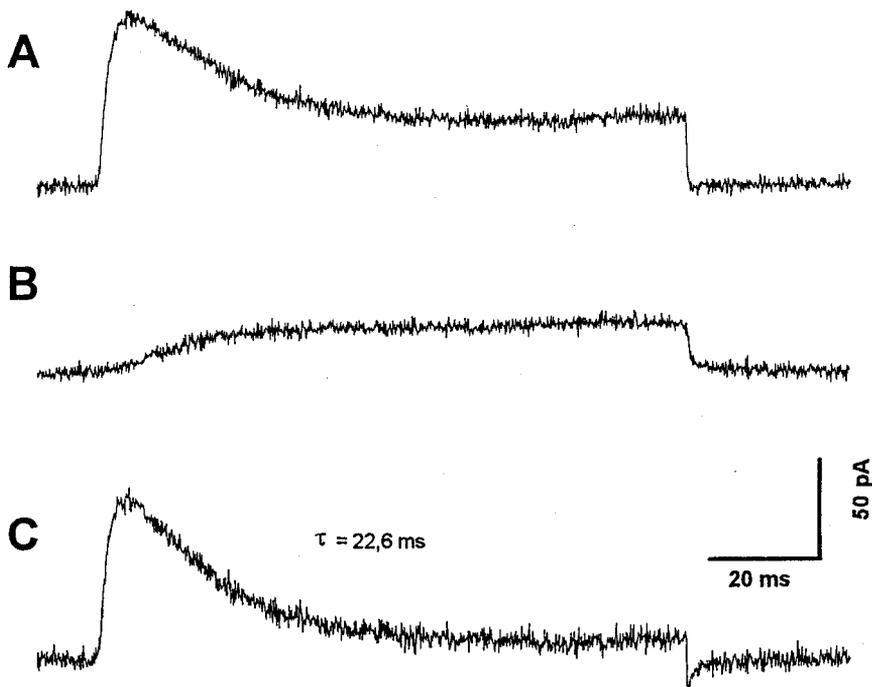


Figura 55. Corrientes de potasio en células pineales. **A.** Registro de corriente activada con pulso de voltaje desde -90 mV a 0 mV de 100 ms. **B.** Registro de corriente de la misma célula que en A obtenida con un pulso despolarizante de 100 ms desde un potencial de membrana de -60 a 0 mV (corriente de K^+ del tipo rectificador tardío, I_{DR}). **C.** Substracción de del registro en B al registro en A resultando una corriente de K^+ del tipo I_A . La inactivación de ésta corriente se ajustó satisfactoriamente a una exponencial simple con una constante de tiempo indicada en la figura. La solución externa (en mM) 145 ClNa, 2.7 ClK, 2.5 Cl_2 Ca, 1 Cl_2 Mg, 10 Hepes, 10 glucosa. La solución interna (en mM) 150 ClK, 0.35 EGTA- K_2 , 0.225 EGTA-Ca, 10 Hepes.

Resultados

a la corriente total registrada a -90 mV (A) la registrada a -60 mV(B): una corriente de activación rápida ($t_{0-100\%}$ 3.1 ms) que se inactivó con un curso monoexponencial ($\tau = 22.6$ ms), y que correspondió, por sus características cinéticas, con una corriente del tipo I_A .

4.1.2. Corrientes activadas por agonistas externos (NA y ACh)

Se estudió el efecto de NA y ACh sobre la permeabilidad de la membrana en células sometidas a fijación de voltaje *en configuración de célula completa*. Ambos agonistas activaron transitoriamente distintas conductancias iónicas.

4.1.2.1. NA y ACh inducen la activación de una conductancia de K^+

La Figura 56 A muestra el registro de corriente macroscópica de una célula estimulada con ACh durante el tiempo indicado por la barra. El agonista activó una corriente transitoria *hacia fuera* que fue seguida, 30 segundos después del final de la aplicación, por un segundo incremento transitorio de la corriente. En este experimento, el potencial de membrana impuesto fue 0 mV (E_{Cl}), un potencial al cual el único vehículo de carga que pudo producir una corriente *hacia fuera* de la célula fue K^+ .

Pilocarpina, un agonista muscarínico, también activó esta corriente de K^+ (en 5 de 7 células) (figura 56 B). Igualmente, este mismo agonista también activó una corriente de Cl^- ($n=5$, véase apartado 4.1.2.3.), lo que sugiere que la activación de la corrientes por ACh fue a través de receptores muscarínicos

4.1.2.1.1.. La corriente de K^+ activada por agonista es dependiente de Ca^{2+}

Para ver si la activación de la corriente de K^+ estuvo mediada por un incremento de la concentración de calcio libre citosólico se dializaron células con solución de

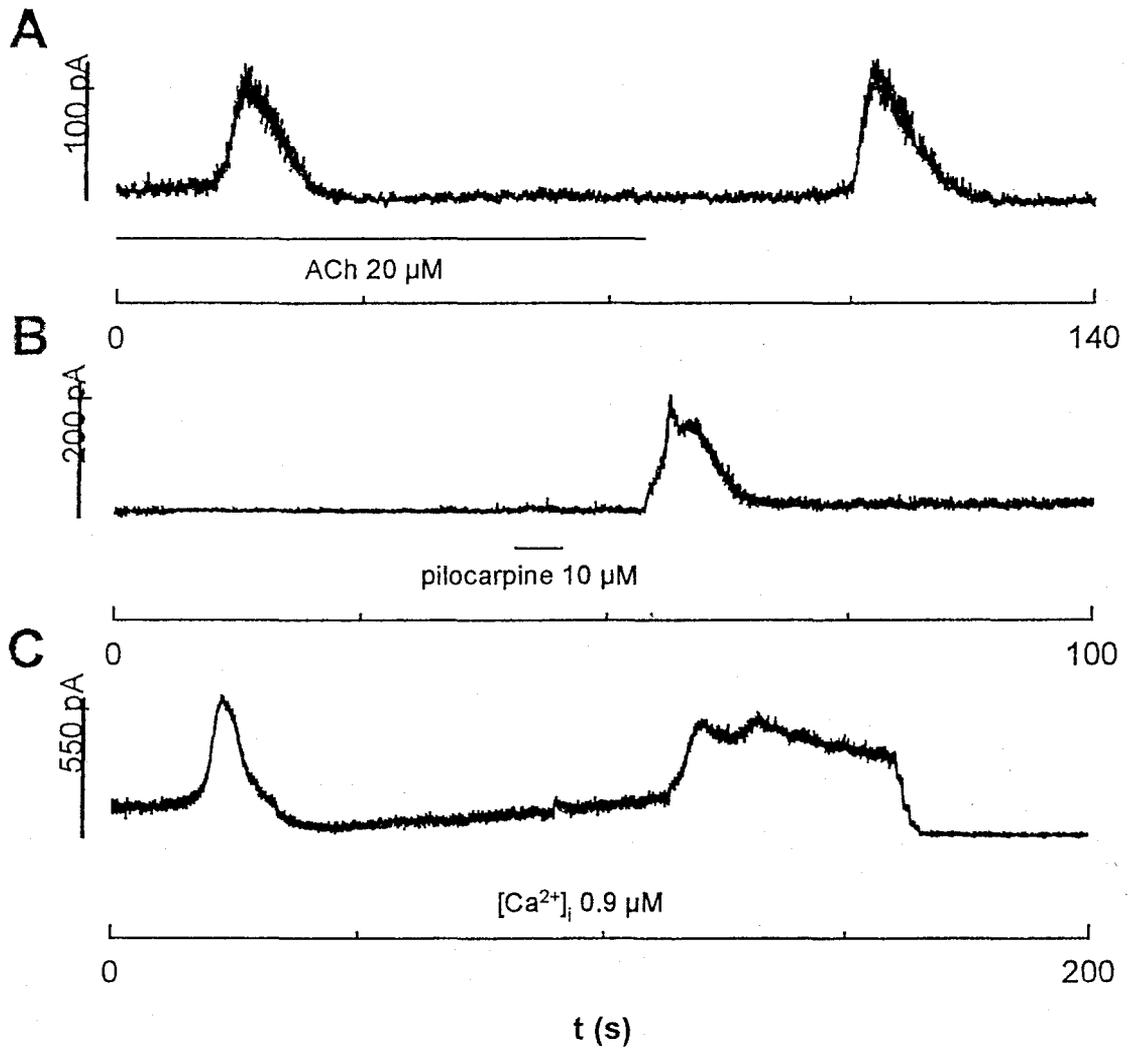


Figura 56. Activación muscarínica de corrientes de K⁺ registradas en configuración de célula completa. **A.** Corrientes transitorias inducidas por la aplicación de ACh durante el tiempo indicado con barras. $V_m = E_{Cl} = 0$ mV. **B.** Efecto de la aplicación de pilocarpina en otra célula. $V_m = -40$ mV. $E_{Cl} = 0$ mV. **C.** Registro de una célula dializada con solución de ato Ca²⁺ (~ 900 nM) a un $V_m = -50$ mV. La primera aplicación fue transitoria y empezó 15 s después de dar acceso al interior celular. $E_{Cl} = -50$ mV, $E_K = -100$ mV

Resultados

distintas concentraciones de Ca^{2+} .

En la célula de la figura 56 C, 15 s después de acceder al interior celular con la ruptura del parche de membrana bajo la pipeta de registro, se activó primero una corriente transitoria hacia fuera y después otra con una cinética de relajación mucho más lenta. En este experimento, el potencial de membrana impuesto fue el de equilibrio para el Cl^- ($E_{\text{Cl}} = -50 \text{ mV}$) y al igual que en la célula ilustrada en el panel A de la figura, el único ión permeable posible que pudo inducir una corriente *hacia fuera* fue K^+ .

Mientras la corriente registrada en la célula de la figura 56 C se mantuvo activada, el potencial de membrana se cambió manualmente hasta alcanzar el potencial de equilibrio para el K^+ , ($E_{\text{K}} = -100 \text{ mV}$, flechas). A este potencial, la corriente se anuló y el ruido eléctrico disminuyó de modo considerable, lo que sugiere nuevamente que la conductancia a K^+ fue la responsable de ésta corriente.

La corriente de K^+ pudo ser activada sin la presencia de nucleótidos en la solución de la pipeta de registro pero no en ausencia de Ca^{2+} (10 EGTA, $n=5$). Estos experimentos sugerían que la corriente positiva inducida por agonistas era debida a la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . En estas células han sido previamente descritos canales únicos de K^+ activados por Ca^{2+} (Ceña, Halperin, Yeandle y Klein, 1991; ver más adelante, Figura 66).

4.1.2.2. NA y ACh también activan una conductancia de Cl

En la mayoría de las células NA o ACh, además de inducir una corriente *hacia fuera* o positiva a potenciales alejados del E_{K} , indujeron, también, una corriente al E_{K} , que indicaba la existencia de otra conductancia, distinta de K^+ , regulada por agonista.

En células en las que el potencial de membrana se mantuvo a valores negativos (-60/-80 mV), subsiguientemente a la aplicación externa de NA (2-4 μM) o ACh (20-50

μM) se registraron inflexiones transitorias de la corriente basal de sentido negativo, como se ilustra en la figura 57 A y B.

Las corrientes obtenidas con NA y ACh tuvieron un curso temporal muy similar. Generalmente, después de una latencia variable de segundos tras el comienzo de la aplicación del agonista, las corrientes se activaron súbitamente hasta un máximo y decrecieron monótonicamente hasta el nivel basal de corriente, a pesar de que se mantuviera la aplicación del agonista.

En soluciones simétricas de Cl^- , cuando el K^+ interno fue reemplazado por Cs^+ , la corriente activada por el agonista fue hacia dentro a potenciales negativos y nula a 0 mV. Por otro lado, cuando el Cl^- en la solución externa fue parcialmente sustituido por glutamato, la corriente activada por agonistas revertió al potencial de equilibrio del Cl^- según la ecuación de Nernst. Estos experimentos indicaron que el ión responsable de la corriente hacia dentro activada por agonista fue el anión Cl^- .

No obstante, se encontraron algunas diferencias, estadísticamente significativas, con respecto a la amplitud y a la cinética de relajación entre las corrientes inducidas por ACh y NA. Las corrientes activadas por NA $4 \mu\text{M}$ fueron menores en amplitud ($318.2 \pm 312.6 \text{ pA}$, media \pm D.E., $n=16$ células) que las inducidas por ACh $20 \mu\text{M}$ (755.4 ± 535.9 , $n=10$). Así mismo, el decrecimiento monótonico de la corriente fue significativamente menor ($p<0.01$) con NA (τ , $2.95 \pm 0.98 \text{ s}$, $n=16$) que con ACh (τ , $4.84 \pm 2.45 \text{ s}$, $n=10$).

4.1.2.2.1. La activación de la conductancia registrada a potenciales negativos depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Una corriente *hacia dentro* (negativa) similar a la activada por los agonistas externos NA o ACh, fue registrada siempre que la célula se dializó con una solución de alto Ca^{2+} en la pipeta de registro ($> 900 \text{ nM}$) (Figura 57C). Esta corriente no se registró



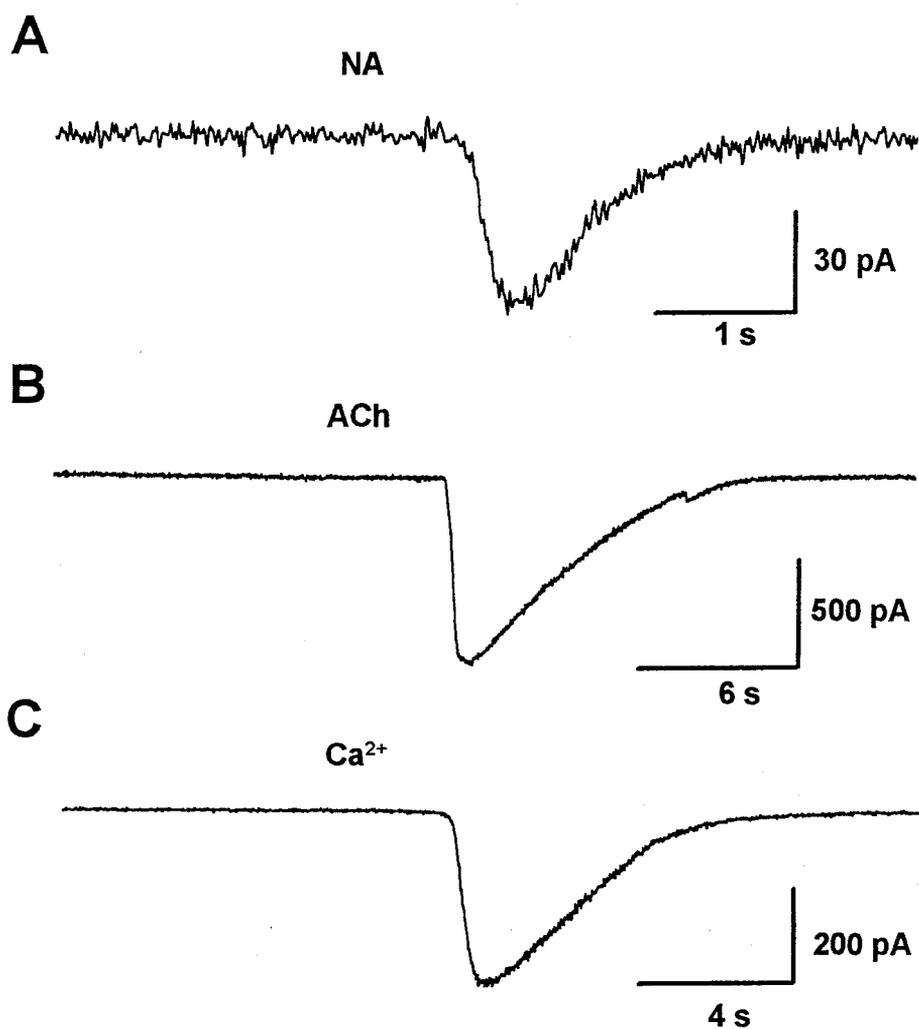


Figura 57. NA y ACh activan una corriente negativa que es dependiente de Ca^{2+} . **A.** Registro de la corriente registrada en una célula sometida a fijación de voltaje de -40 mV tras la aplicación de NA, $2 \mu\text{M}$. **B.** Registro de corriente inducido por la aplicación de ACh $20 \mu\text{M}$ en una célula cuyo potencial de membrana fue impuesto a -48 mV. **C.** Corriente registrada en otra célula tras la dialisis con solución interna de alto Ca^{2+} siendo el potencial de membrana -60 mV.

en ausencia de Ca^{2+} en la solución interna (1 mM EGTA). Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la pipeta fue baja o media (~ 100-260 nM) sólo ocasionalmente se indujo activación de la corriente.

En ausencia de estímulo externo y tras una latencia de algunos segundos después de que se iniciara la diálisis de la célula con una solución de alto Ca^{2+} (48 ± 41.2 s, media \pm D.E., $n=5$), la corriente se desarrolló con un curso temporal similar a las inducidas con ACh o NA (figura 57 C).

La amplitud y constante de tiempo de relajación de la corriente activadas por la diálisis celular con una solución de alto Ca^{2+} fue 468 ± 120.8 pA y $3,34 \pm 0,32$ s (media \pm D.E., $n=5$) respectivamente. Estos valores estuvieron comprendidos entre los valores de amplitud y constante de tiempo obtenidas con NA y ACh, y las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados sugieren que la corriente observada a potenciales negativos tras la aplicación de agonistas externos, NA ó ACh, fue dependiente de Ca^{2+} y resultó de un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} inducida con estos agonistas.

4.1.2.3. Activación simultánea de I_K y I_{Cl}

Para estudiar simultáneamente las conductancias de Cl^- y K^+ , las células fueron sometidas a un potencial de membrana negativo (-90 a -60 mV) desde el cual se aplicaron pulsos cortos en rampas a 0 mV (potencial de equilibrio del Cl^- en estos experimentos) a la célula a una frecuencia de 2-7 Hz (ver Figura 58 donde se ilustra el protocolo de pulsos).

El protocolo descrito con la aplicación sucesiva de pulsos en rampa desde un potencial de equilibrio muy negativo (próximo al E_K y donde la probabilidad de apertura

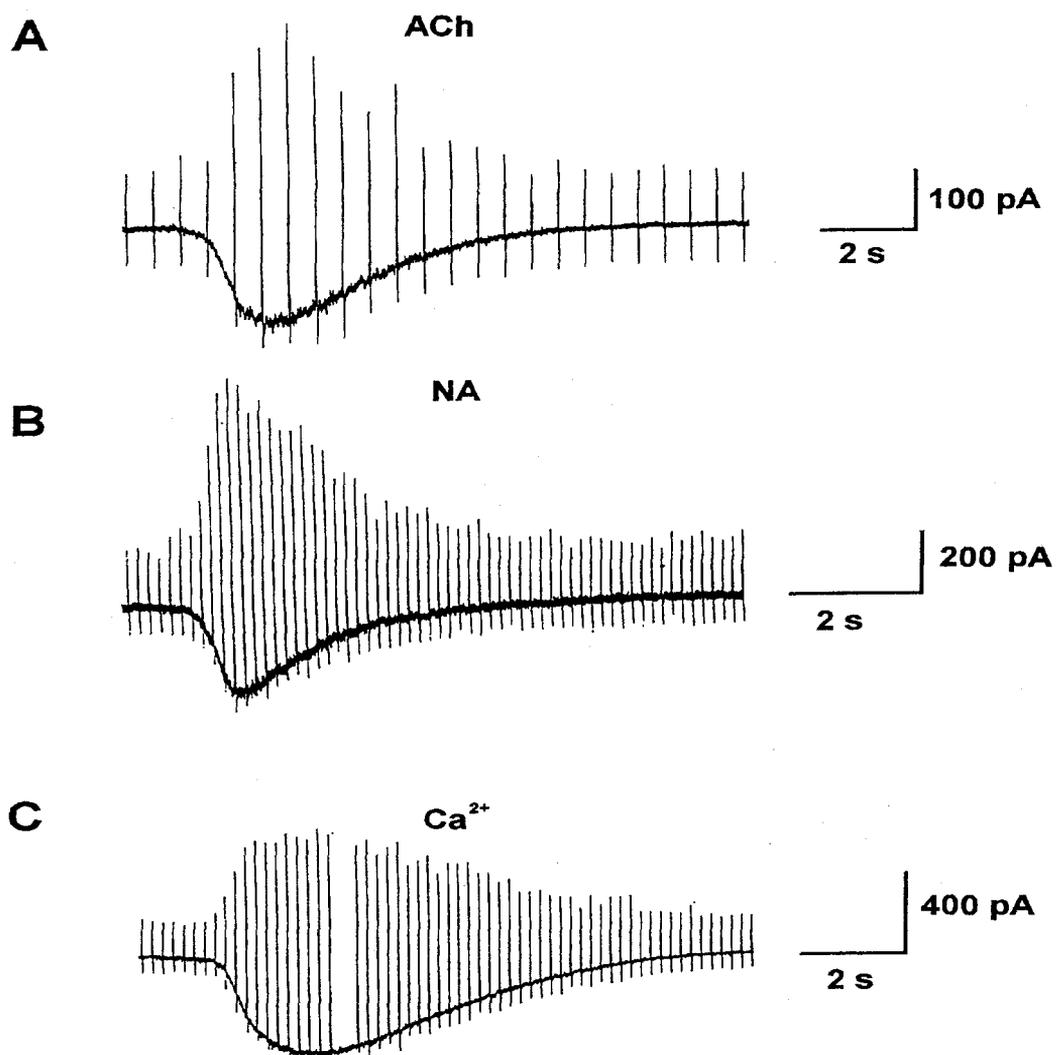


Figura 58. ACh, NA y Ca²⁺ activan una corriente de cloro y potasio. En A, B y C se muestran las corrientes macroscópicas de tres células, respectivamente. El potencial de membrana cambió en rampa desde -60 a 0 mV en 10 ms y regresó a -60 mV en otros 10 ms, 2-6 veces/segundo. E_{Cl} = 0 mV. Las corrientes lineales resistivas y capacitivas no fueron substraidas.

de canales voltaje dependientes es muy baja) hasta el potencial de equilibrio para el Cl^- , permitió monitorizar la $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ en el intervalo entre rampas como una corriente hacia dentro, y la $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ a 0 mV en los vértices de las sucesivas rampas como una corriente hacia fuera.

Independientemente de cual fuera el estímulo aplicado, NA, ACh o Ca^{2+} , ambas conductancias se activaron con una latencia similar, siguiendo la activación y relajación de éstas cursos paralelos, como se ilustra en las figura 58 A, B y C ($n=18$ células).

No obstante, no todas las células presentaron la misma proporción de ambas corrientes, incluso a veces la célula carecía de una de ellas, como en los ejemplos que se muestran en la Figura 59.

4.1.2.3.1. Curvas corriente-voltaje de $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ y $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$

En la Figura 60 A se muestra una rampa de voltaje, con su correspondiente corriente, durante la activación de la célula mostrada en la figura 59 A. En la relación corriente-voltaje (figura 60 B) de ésta conductancia de Cl^- se observa que la corriente decreció linealmente con la despolarización, conforme el potencial impuesto en rampa se aproximaba al de equilibrio para el Cl^- ($E_{\text{Cl}^-} \sim 0$ mV). Así mismo, $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ fue activada indistintamente en un rango de potenciales de membrana impuestos desde -90 a -20 mV, lo que sugiere, junto con la morfología lineal de su curva I-V, que su activación no es dependiente de voltaje, al menos en el rango de voltajes estudiado.

En la Figura 59 B se muestra el registro de una corriente de K^+ inducida agonista en una célula cuyo potencial de membrana se sometió a un protocolo de rampas similar al anterior (-60- 0 mV, 5 Hz) en una célula en la que $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ fue nula o mínima. De la corriente registrada durante la activación inducida por agonista y con una de éstas rampas (Figura 61 A) se estableció una relación corriente -voltaje para $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ (figura 61 B). En esta curva se aprecia que, aún siendo el E_{K} muy negativo (-100 mV), la conductancia

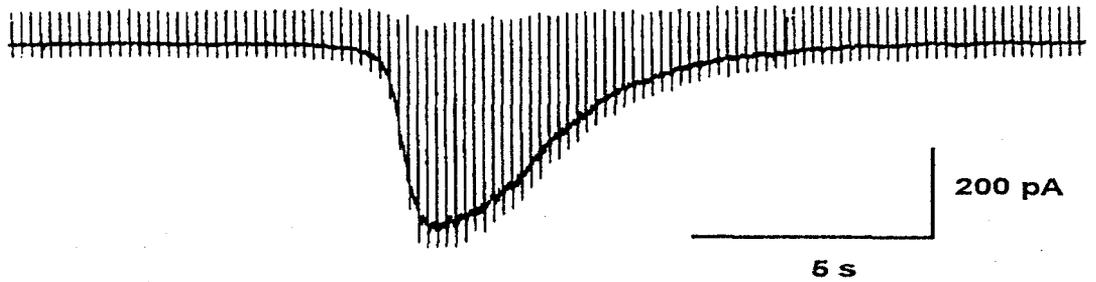
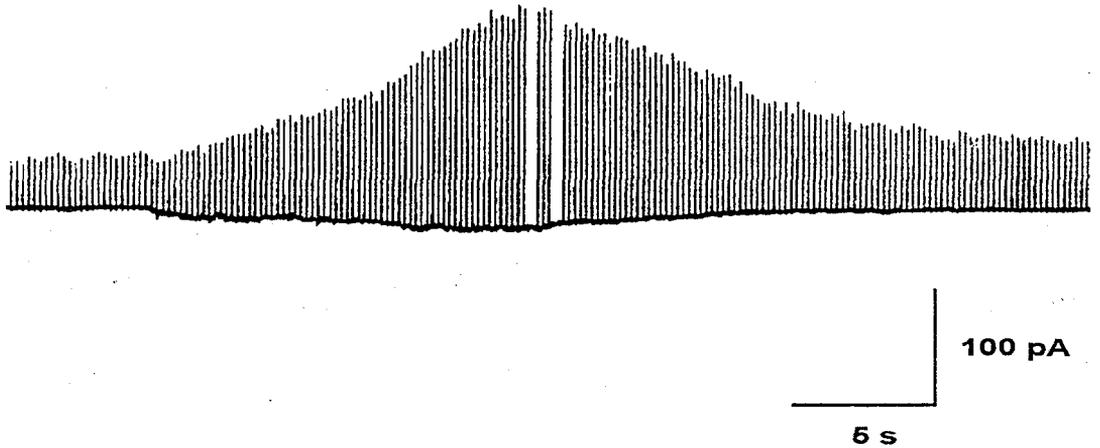
A**B**

Figura 59. Células que sólo presentaron I_{Cl} ó I_K . **A.** Registro de una célula que careció de corriente de K^+ activada por Ca^{2+} . $V_m = -60$ mV, $E_{Cl} = 0$ mV, $E_K = -100$ mV. Estímulo NA+propranolol ($10 \mu M + 5 \mu M$). **B.** Célula que prácticamente careció de corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} sin embargo mayoritaria la de K^+ . $V_m = -60$ mV, $E_{Cl} = 0$ mV, $E_K = -100$ mV. Estímulo PE, $1 \mu M$.

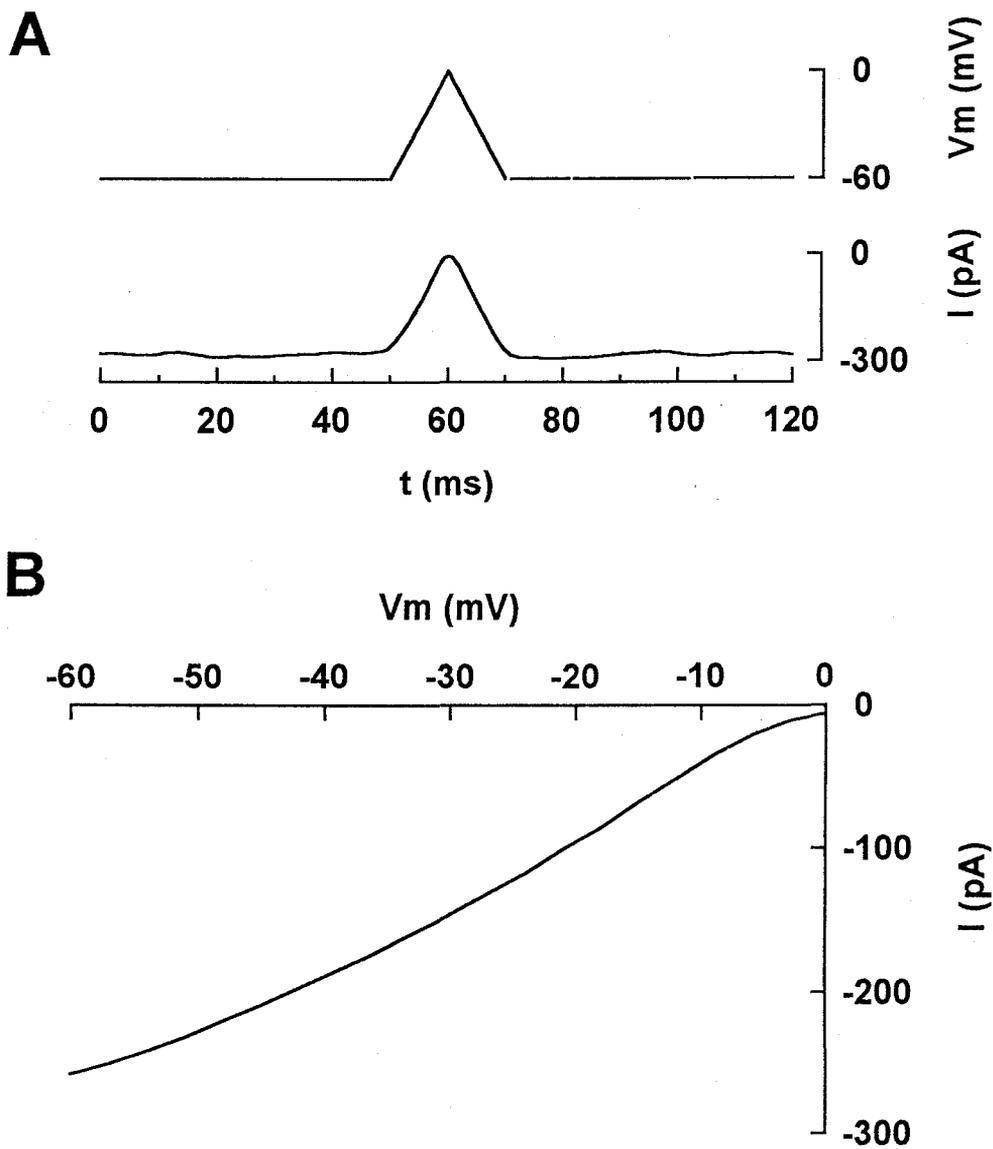


Figura 60. La corriente negativa activada por NA y ACh es de Cl^- . **A.** En la parte superior, protocolo de rampa de voltaje al que se sometió el potencial de membrana de una célula tras activación de una corriente negativa inducida por agonista. En la parte inferior, corriente registrada durante la rampa de voltaje. **B.** Relación corriente-voltaje para la corriente de Cl^- registrada en A. El potencial de equilibrio para el Cl^- y el K^+ fue 0 mV y -90 mV, respectivamente.

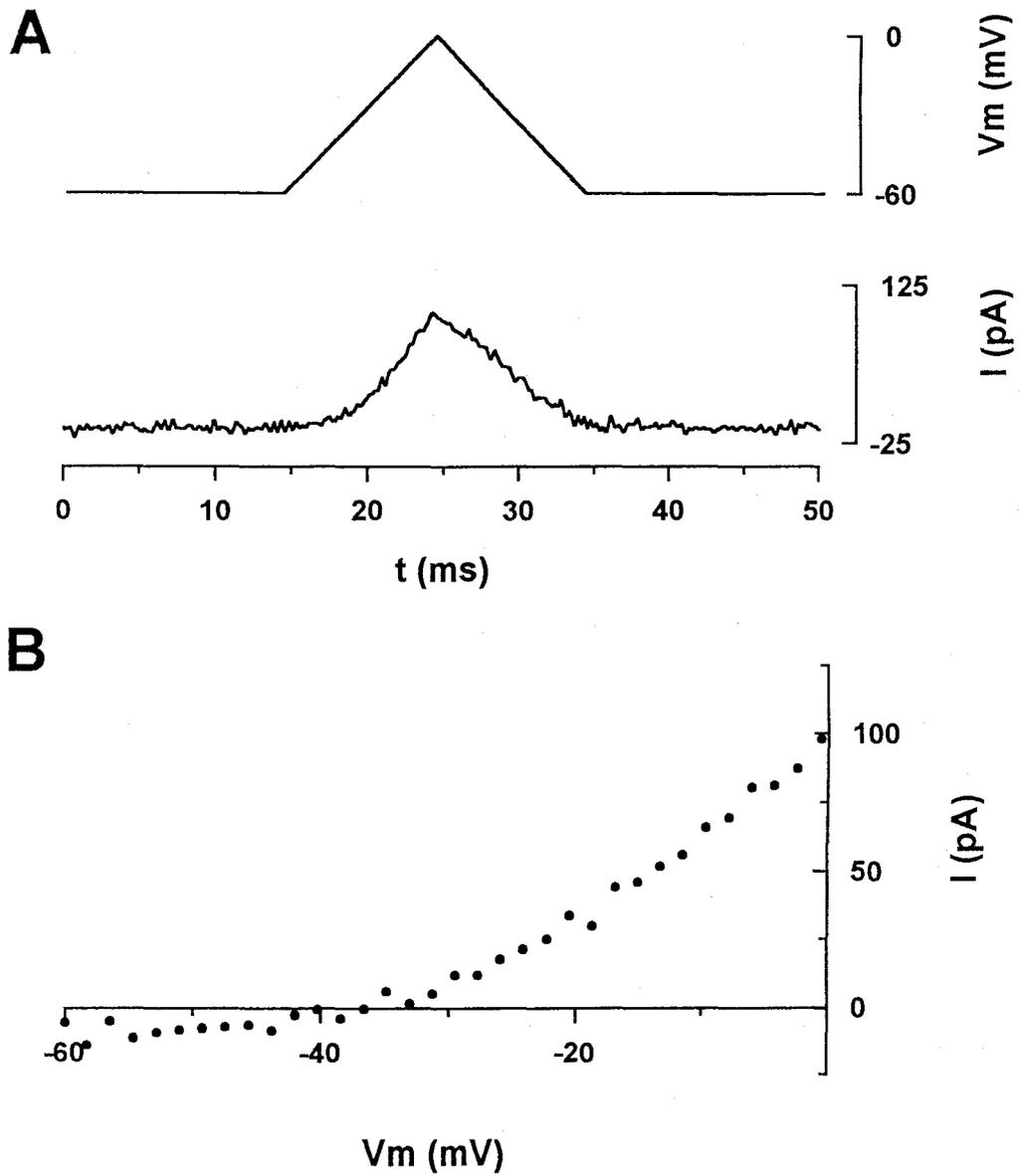


Figura 61. Dependencia de voltaje de $I_{K(Ca)}$. **A.** Registro de $I_{K(Ca)}$, de la célula de la figura x, durante la aplicación de una rampa de voltaje desde un potencial de membrana a -60 mV hasta 0 mV en 10 ms. **B.** Relación corriente-voltaje para $I_{K(Ca)}$. La corriente hacia dentro se debió a una pequeña $I_{Cl(Ca)}$ residual.

no se activó hasta un umbral de ~ -40 mV. Ello indica que la corriente de K^+ inducida por agonista es dependiente de voltaje.

4.1.2.3.2. La activación de $I_{Cl(Ca)}$ y $I_{K(Ca)}$ por NA es mediada a través de receptores α_1 -adrenérgicos

La presencia en la solución externa de un antagonista selectivo de los receptores β -adrenérgicos, propanolol (1-5 μ M), no impidió la activación de ninguna de las corrientes que NA induce (5 células). En la Figura 62 A, se muestra el registro de las corrientes de potasio y cloro activadas por la aplicación de NA, 4 μ M, en presencia de propanolol, 5 μ M.

Por otro lado, la aplicación de un agonista específico de los receptores α_1 adrenérgicos, PE (1-4 μ M) indujo la activación de corrientes de cloro y potasio de características similares a las inducidas por NA (3 células). La figura 62 B ilustra la activación de $I_{Cl(Ca)}$ y $I_{K(Ca)}$ en una célula estimulada por la aplicación de PE, 4 μ M.

Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos sobre el incremento de la concentración de calcio citosólico inducido por NA a través de la activación exclusiva de receptores α_1 -adrenérgicos.

4.1.2.4. Estudio de las $I_{Cl(Ca)}$ e $I_{K(Ca)}$ inducidas con soluciones de Ca^{2+}

En 13 células se activaron las corrientes $I_{Cl(Ca)}$ y/o $I_{K(Ca)}$ sin la aplicación de estímulo externo. En 10 de estas células la diálisis celular con solución de alto Ca^{2+} (calcio libre entre ~ 900 nM y ~ 1 μ M) fue responsable de la activación. En las 3 células restantes, las células se dializaron con una $[Ca^{2+}]$ de 100-260 nM. No obstante, la eficacia en inducir corrientes con soluciones de medio/bajo Ca^{2+} fue menor que con soluciones de alto Ca^{2+} . No se registraron corrientes en células dializadas con solución de 0 Ca^{2+} nominal (no Ca^{2+} añadido y 10 EGTA, $n = 9$) tras varios minutos de diálisis,

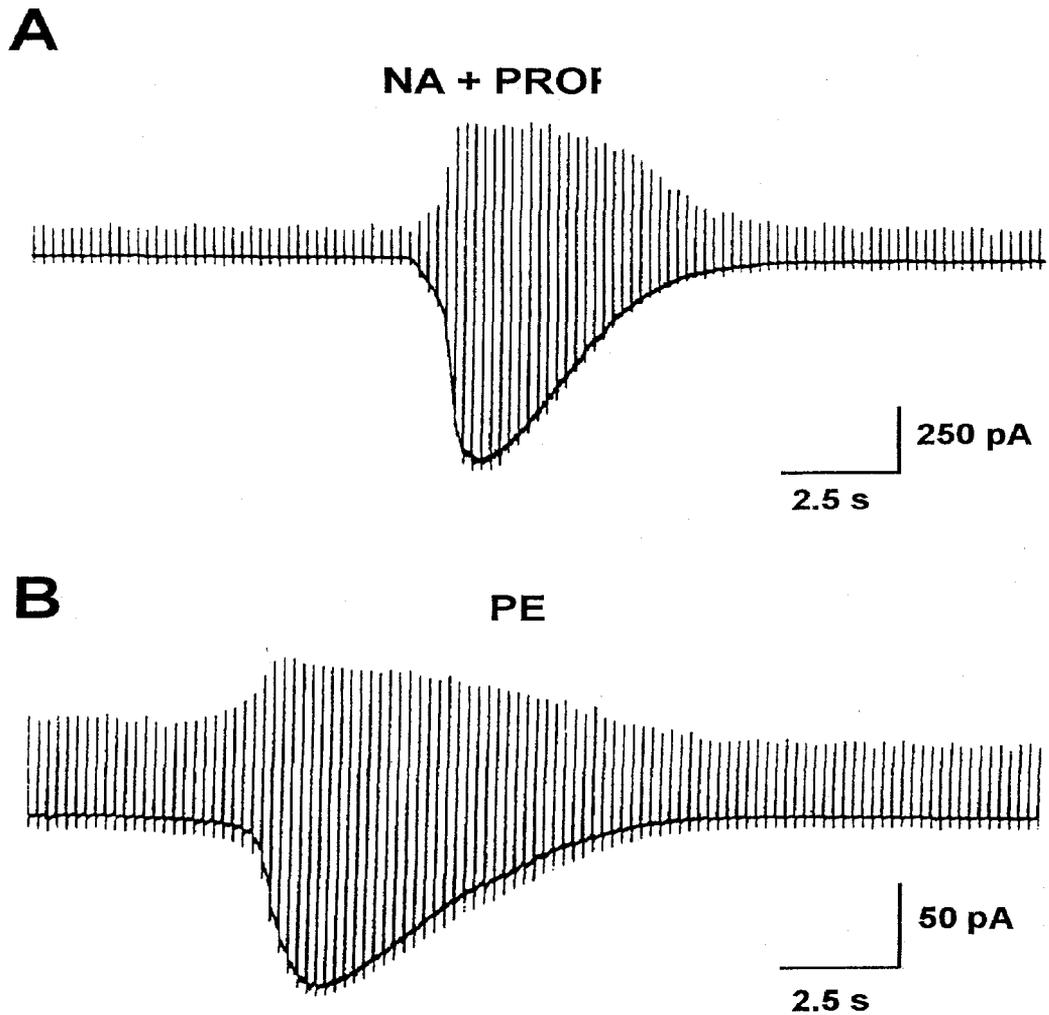


Figura 62. La activación de I_K y I_{Cl} inducida por NA está mediada por receptores α_1 -adrenérgicos. **A.** Corrientes iónicas inducidas por la aplicación de $4 \mu\text{M}$ NA + $5 \mu\text{M}$ propanolol. El voltaje durante la rampa cambió desde -60 mV a 0 mV . **B.** Registro de otra célula. El estímulo fue PE, $4 \mu\text{M}$, y la rampa de voltaje varió desde -85 mV a 0 mV .

entre 3 y 11 minutos.

Los transitorios de corriente inducidos por la diálisis celular con solución de alto Ca^{2+} ocurrieron súbitamente con una latencia de 48 ± 41.2 s (media \pm D.E., $n=5$), antes de que la difusión de Ca^{2+} desde la pipeta de registro, a través de su punta (un área de pocas μm^2) alcanzara el equilibrio con el interior celular (100 s; tiempo de difusión estimado sin tener en cuenta los tampones de Ca^{2+} intracelulares, Push y Neher, 1988).

Una liberación transitoria de Ca^{2+} de almacenes intracelulares inducida por la difusión de Ca^{2+} desde la pipeta sería compatible con la morfología de los transitorios de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ e $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ registrados.

Se observó la activación permanente de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ e $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ con un curso cinético compatible con un modelo de difusión. En la Figura 63 A, se ilustra un transitorio simultaneo de corrientes de Cl^- y K^+ que se produjo tras 30 segundos de diálisis con Ca^{2+} . Al cabo de ~60 segundos se inició una segunda activación, ésta vez no transitoria en decenas de segundos de registro. En la figura 63 B se muestra una activación en cascada y permanente de una $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ de una célula, tras varios segundos después de ser dializada con solución de alto Ca^{2+} (1 μM) y Cs^+ (para sustitución iónica del K^+ intracelular).

4.2. POTENCIAL DE MEMBRANA

Como se vio en el apartado anterior (4.1, CORRIENTES IÓNICAS), la estimulación colinérgica muscarínica, así como, la adrenérgica, activan dos conductancias (I_{Cl} e I_{K}) a través del un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En el presente apartado, se muestran los resultados obtenidos del estudio de las variaciones del potencial de membrana inducidas por la aplicación local de ACh. Para la monitorización del potencial

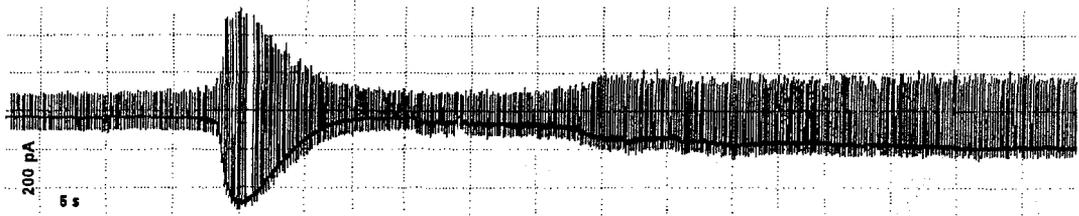
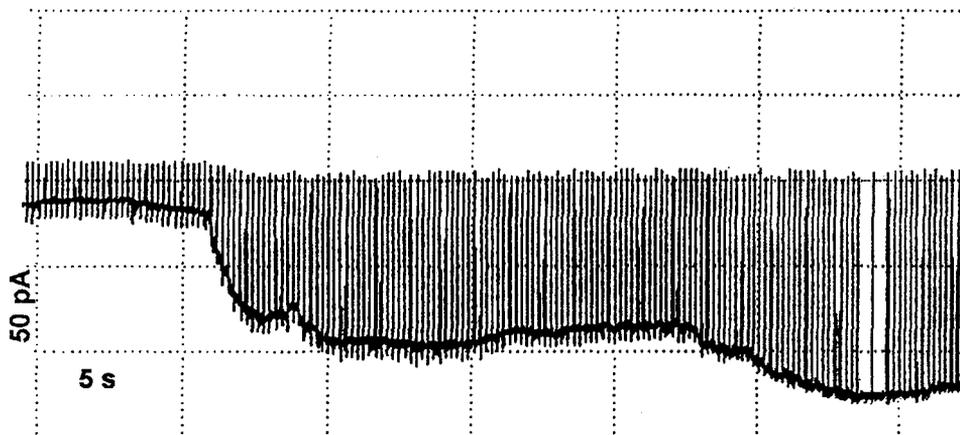
A**B**

Figura 63. La diálisis celular con alto Ca^{2+} indujo la activación permanente de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ e $I_{\text{K}(\text{Ca})}$. A. Célula en la que tras 30 s de diálisis con alto calcio ($\sim 900 \text{ nM}$) se indujo un transitorio de corrientes activadas por Ca^{2+} , y tras 60s las corrientes empezaron a aumentar de modo irreversible. La solución externa (en mM): 145 ClNa, 2.7 ClK, 2.5 Cl_2Ca , 1 Cl_2Mg , 10 HEPES, 20 glucosa. La solución interna (en mM): 150 ClK, 7 Cl_2Mg , 1.8 EGTA-Ca, 0.2 EGTA- K_2 , 10 HEPES. B. Célula en la que la diálisis con alto Ca^{2+} ($\sim 1 \mu\text{M}$) indujo un incremento irreversible de la $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. La solución externa igual que en A, y la interna (en mM): 150 ClCs, 7 Cl_2Mg , 2.7 EGTA-Ca, 0.3 EGTA- K_2 , 10 HEPES. El protocolo de pulsos consistió en aplicar cada 200 ms desde un potencial de membrana de -60 mV , rampas simétricas a 0 mV , que invertían 20 ms en subir y bajar.

de membrana se han utilizado dos modalidades de la técnica de "patch-clamp". Una, más convencional, el registro en fijación de corriente a través de un parche de membrana perforado con nistatina. Otra, la monitorización de los cambios de amplitud de la corriente a través de un único canal en células no dializadas (registro *in situ*).

4.2.1. Registro en fijación de corriente

El potencial de membrana registrado con la técnica de "patch-clamp", en fijación de corriente, a través de un parche de membrana perforado con nistatina fue de -32.1 ± 8.1 mV (media \pm D.E., $n=12$).

En 9 de 10 células, la aplicación de ACh provocó la despolarización transitoria del potencial de membrana. Esta respuesta estuvo precedida o seguida de una hiperpolarización, también transitoria, en tres células. La Figura 64 ilustra ejemplos de respuestas observadas. En la parte A se muestra el efecto de ACh en una célula con un potencial de membrana de ~ -37 mV. Tras la aplicación del agonista, la membrana se despolarizó 30 mV, retomando subsiguientemente a su valor inicial. En esta célula, dos aplicaciones previas de ACh produjeron respuestas de similar amplitud aunque la cinética de la despolarización se hizo más lenta con cada aplicación, el tiempo al pico fue 2, 6 y 9 s respectivamente.

La parte B de la figura 64 ilustra un tipo de respuesta diferente registrado en otra célula. Aquí, ACh indujo una respuesta bifásica que consistió en una despolarización transitoria, rápida y de corta duración, de 10 mV, seguida de una lenta y larga hiperpolarización también transitoria de 10 mV.

Las modificaciones del potencial de membrana inducidas por ACh en otra célula se muestra la figura 64 C y D. La primera aplicación de ACh produjo una pequeña y corta hiperpolarización seguida de una lenta despolarización (10 mV) de mayor duración (C). La segunda aplicación indujo únicamente una respuesta despolarizante de larga duración

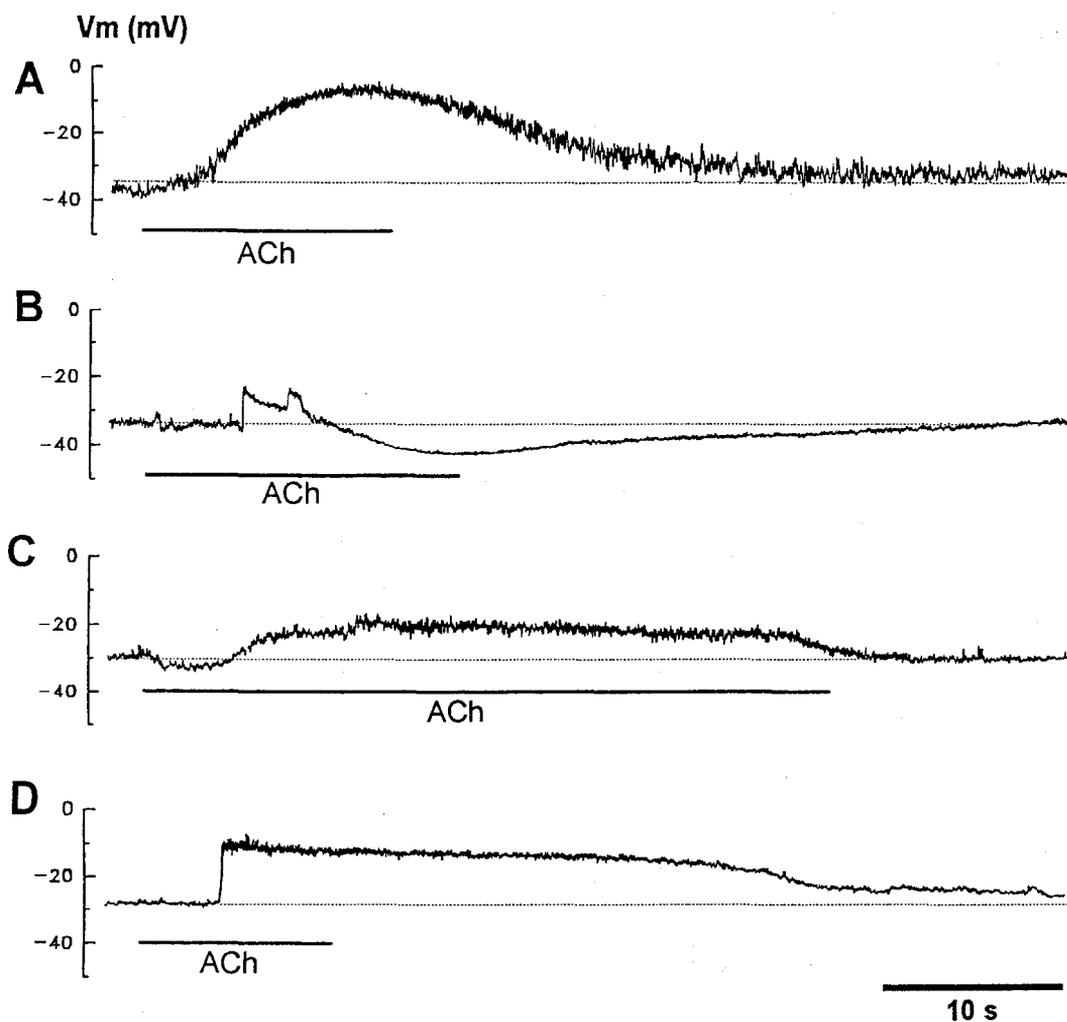


Figura 64. Registro mediante fijación de corriente de los cambios del potencial de membrana inducidos con ACh. Los registros fueron realizados empleando la técnica de "patch-clamp" e incluyendo nistatina (250 $\mu\text{l/ml}$) en la pipeta, y proceden de tres células (A, B y C-D, respectivamente). ACh, 20 μM , fue aplicada durante el tiempo indicado con barras horizontales.

de 18 mV de amplitud (D).

4.2.1.1. El potencial de reversión

En nuestras condiciones iónicas experimentales, el potencial de equilibrio de las conductancias activadas por ACh varió de célula a célula entre -25 y -5 mV. Para obtener el potencial de reversión, se estimuló la célula con el agonista desde distintos potenciales de membrana, como en el ejemplo que se ilustra en la Figura 65. En esta célula, se aplicó ACh desde -55 y -12 mV, respectivamente. En el primer caso, el agonista indujo una despolarización hasta un nivel de -25 mV. En el segundo caso, la aplicación del agonista produjo una hiperpolarización hasta un valor de -20 mV, indicando que en esta célula el potencial de reversión de las corrientes activadas por ACh fue entre -20 y -25 mV.

4.2.2. Modificaciones de amplitud de una corriente unitaria *in situ*

La principal dificultad que presenta la interpretación de las modificaciones del potencial de membrana registradas con la técnica de "patch-clamp" en fijación de corriente viene derivada de los cambios de los potenciales equilibrio de las conductancias responsables del potencial de membrana, introducidos con la diálisis celular.

Para tener una estimación de los cambios del potencial de membrana inducidos por ACh en células con el medio interno intacto, se registró en un microárea de membrana *in situ* las modificaciones de la amplitud de la corriente unitaria a través de un canal de K^+ activado por Ca^{2+} ($i_{K(Ca)}$) antes, durante y después de la aplicación del agonista a la célula.

Una vez localizado un único canal ($i_{K(Ca)}$) en un microárea de membrana *in situ*, y antes de la aplicación del agonista, se realizó su curva corriente-voltaje (Figura 66).

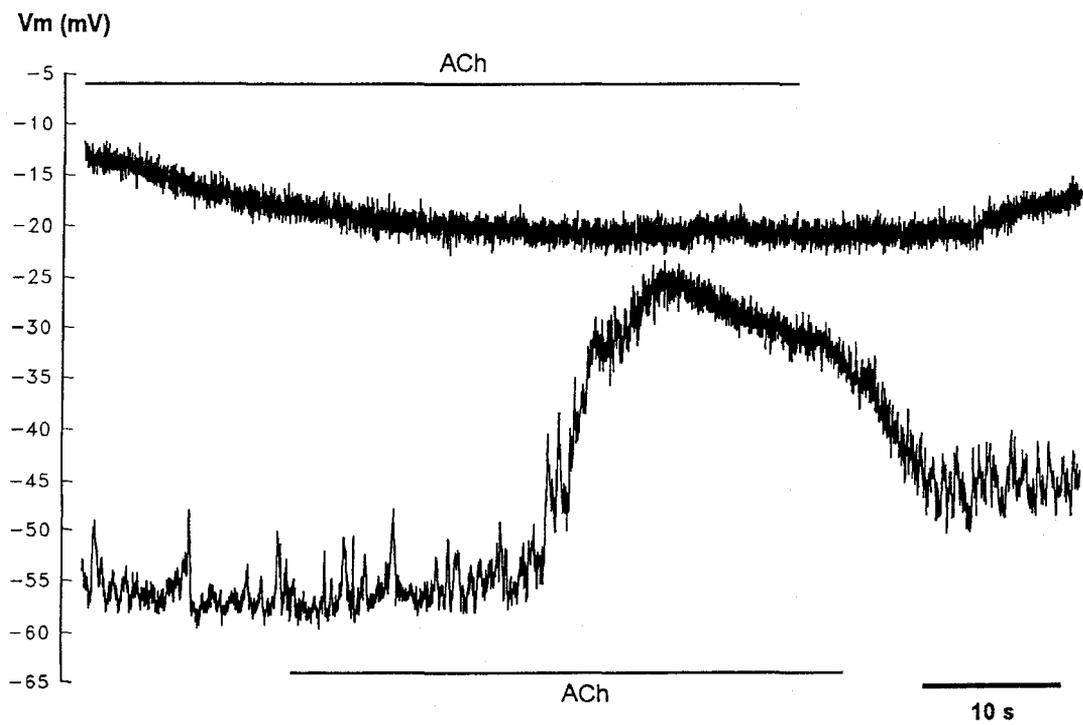


Figura 65. Potencial de membrana de reversión. Respuesta a la aplicación de ACh en la misma célula desde dos potenciales de membrana diferentes (~ -12 y -55 mV)

Esto permitió conocer la conductancia unitaria del canal y por tanto, la correspondencia entre los cambios de potencial eléctrico y las variaciones de la amplitud de la corriente. En la figura 66 A se puede observar el registro del canal a distintos potenciales en la pipeta (V_p). A V_p entre +40 y -30 mV la corriente a través del canal abierto apareció como una inflexión de la corriente basal hacia arriba (corriente *hacia fuera*, desde la pipeta a la célula), de mayor amplitud con voltajes más positivos.

Cuanto más negativo fue el potencial en la pipeta (V_p), más frecuentes y duraderas fueron las aperturas del canal, cuyas corrientes unitarias disminuyeron en amplitud para invertirse a un V_p de -40 mV. Probablemente, éste sería un valor muy próximo al potencial de membrana de la célula, puesto que la concentración de K^+ en solución en la pipeta era, presumiblemente, muy similar a la intracelular ($E_K \sim 0$ mV).

La disminución de amplitud de la corriente que se observó durante las aperturas prolongadas del canal pudo deberse a una despolarización local del potencial del microárea de membrana, debido a la entrada de potasio en la célula que tuvo lugar a V_p más positivos de -40 mV.

Después de haber obtenido la curva $i-V_p$, el potencial de la pipeta se impuso de forma constante a 0 mV y se registró el efecto de la aplicación de ACh. En la Figura 67 se muestra el registro del canal con el que se monitorizó los cambios de voltaje, desde la aplicación de ACh hasta que se escindió el microárea de membrana. La exposición de la cara interna de la membrana a la solución externa, con un calcio libre estimado en 10 μ M, supuso un aumento dramático de la probabilidad de apertura del canal, lo que sugirió nuevamente, que aquél era un canal de K^+ activado por Ca^{2+} .

El cambio en la amplitud de la corriente unitaria en respuesta a ACh fue debido, probablemente, a una variación del gradiente electroquímico para el potasio ($V_m - E_K$). Si la concentración de K^+ intracelular no cambió significativamente, entonces las variaciones de la amplitud observadas fueron debidas a variaciones del potencial de

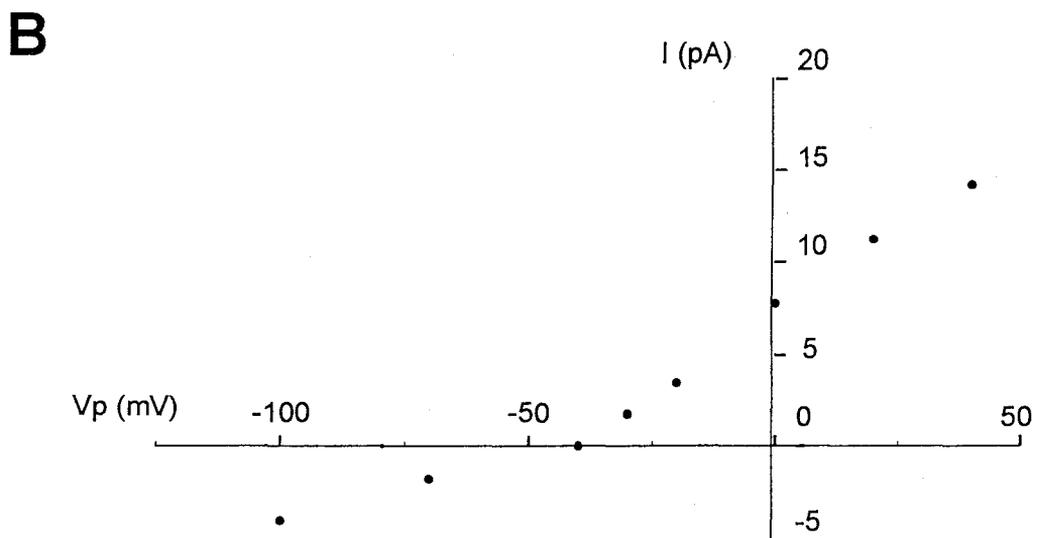
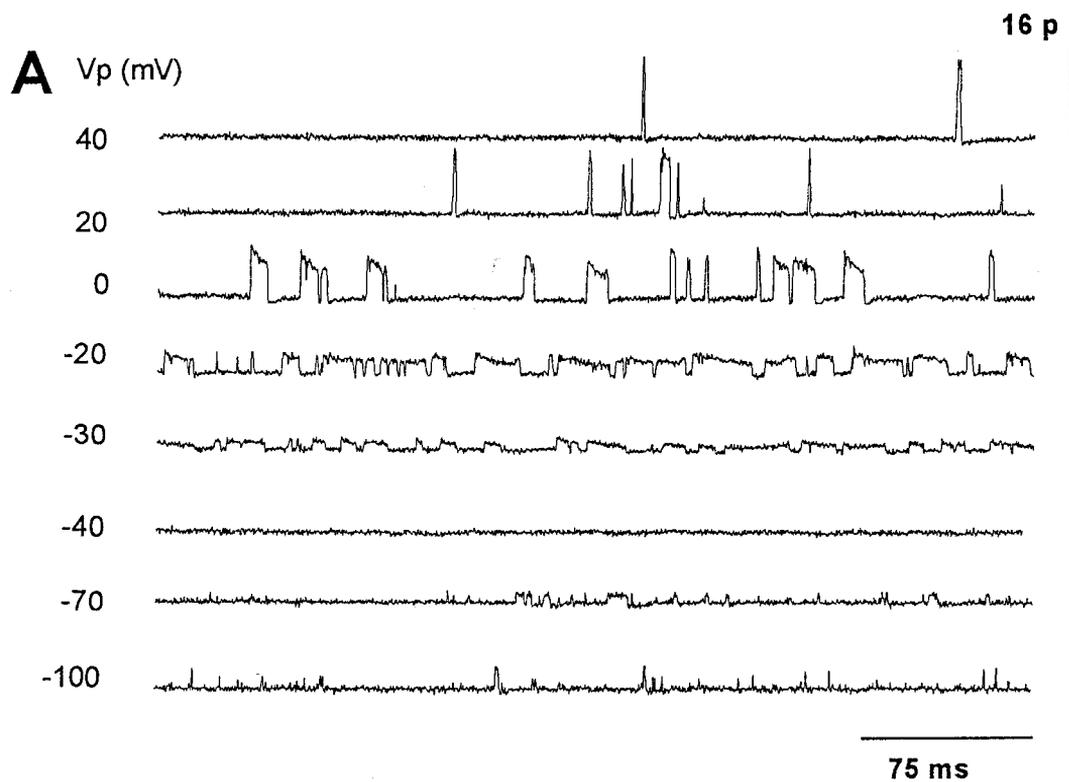


Figura 66. Relación corriente-voltaje para el canal de K^+ activado por Ca^{2+} . **A.** Registro de corrientes unitarias a distintos voltajes realizado en microárea de membrana *in situ*, en la misma célula de la figura x. **B.** Relación corriente-voltaje del registro mostrado en A. Ganancia 50 pA/mV, filtro 1 KHz. La solución externa (en mM) 145 ClNa, 10 Cl_2Ca , 10 HEPES, 20 glucosa. La solución de la pipeta (en mM): 140 ClK, 7 Cl_2Mg , 0.35 EGTA- K_2 , 0.225 EGTA-Ca, 10 HEPES.

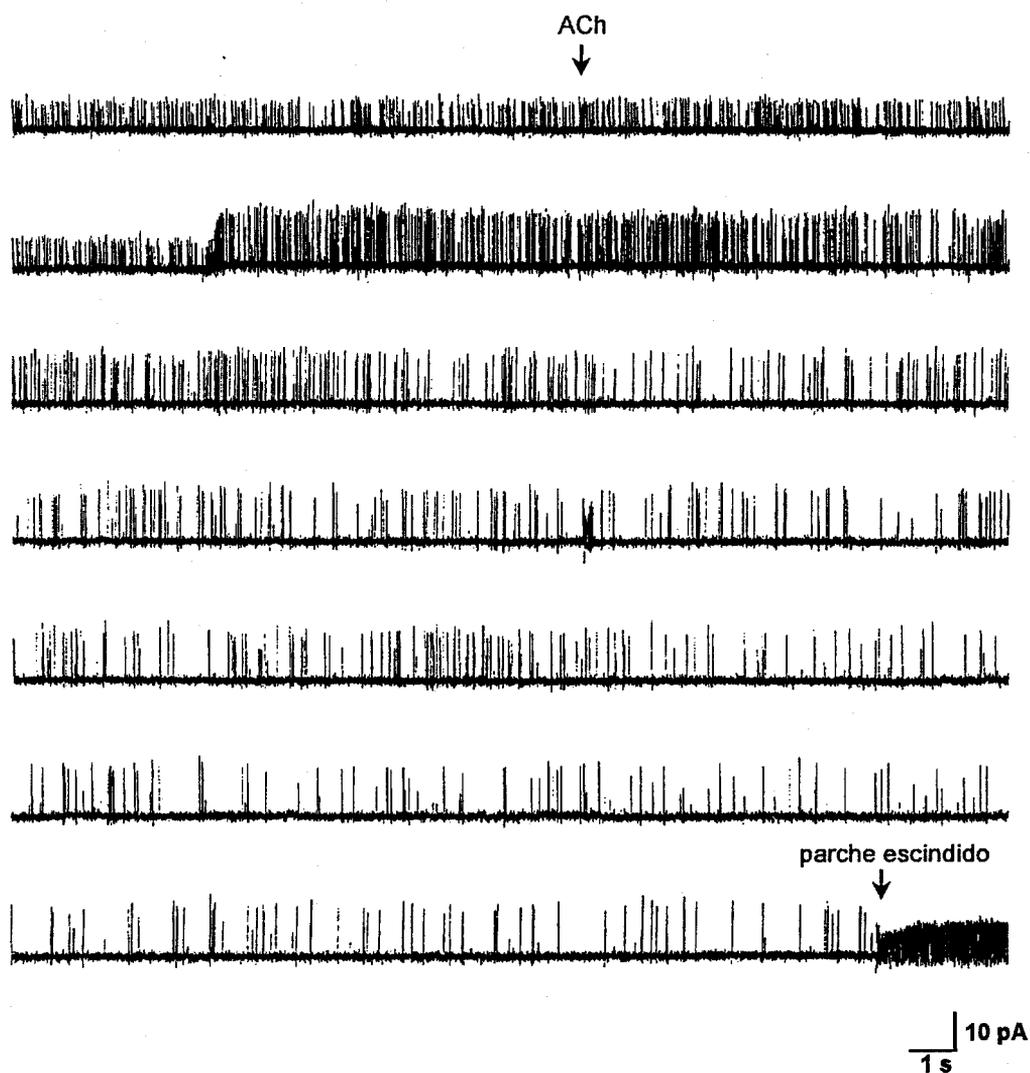


Figura 67. Efecto de ACh sobre las corrientes a través de canales únicos de K^+ activados por Ca^{2+} . Registro en microarea de membrana *in situ*. Potencial en la pipeta 0 mV, ganancia 50 pA/mV, filtro 1 KHz. La solución externa (en mM): 145 ClNa, 10 Hepes, 20 glucosa. La solución en la pipeta (en mM): 140 ClK, 7 Cl_2Mg , 0.35 EGTA- K_2 , 0.225 EGTA-Ca. Las flechas indican cuando empezó la aplicación de ACh (10 μ M, 6 s) y la excisión del parche de membrana, respectivamente.

Resultados

membrana.

Las variaciones del potencial de membrana inducidas con ACh fueron analizadas (Figura 68). A un potencial de 0 mV, la corriente a través del canal fue 6.91 ± 0.96 pA. (media \pm D.E). Después de la aplicación de ACh, y con un retraso de ~ 12 segundos, la corriente unitaria disminuyó a un valor de 5.29 ± 0.96 pA durante unos 500 ms. Este decremento fue seguido de un incremento progresivo en la amplitud que alcanzó un máximo de 12.7 ± 0.73 pA y que se mantuvo por varios minutos (figura 68 C).

A partir del valor de conductancia del canal previamente obtenido, se pudo estimar que la disminución de la amplitud de la corriente unitaria correspondió a una despolarización del Vm de 20 mV. Del mismo modo, se estimó que el incremento de la corriente a través del canal fue reflejo de una hiperpolarización de 35 mV (figura 68 B).

4.2.3. Despolarizaciones transitorias espontaneas en espiga

Aunque, aproximadamente, en la mitad de las células el potencial de membrana registrado en fijación de corriente fue estable en ausencia de estímulo externo, en 5 de 12 células, se observaron despolarizaciones transitorias espontaneas rápidas en espiga (Figura 69). Estos cambios transitorios del potencial de membrana fueron de pequeña amplitud (1-13 mV), tuvieron una apariencia de espiga (con una duración a la mitad de la amplitud, $t_{1/2}$, de hasta 100 ms).

En la Figura 70 se muestra el registro de las variaciones del potencial de membrana de otra célula ($V_m = -80$ mV; inyección de corriente = -40 pA) en forma de despolarizaciones espontaneas en espiga. No obstante, las despolarizaciones fueron de menor amplitud y de menor frecuencia que las observadas en la célula de la figura 69. La aplicación de ACh en esta célula dio lugar a una despolarización lenta de ~ 60 mV de amplitud coincidente con un incremento de la frecuencia de las señales en espiga. Una respuesta similar se observó en otras dos células.

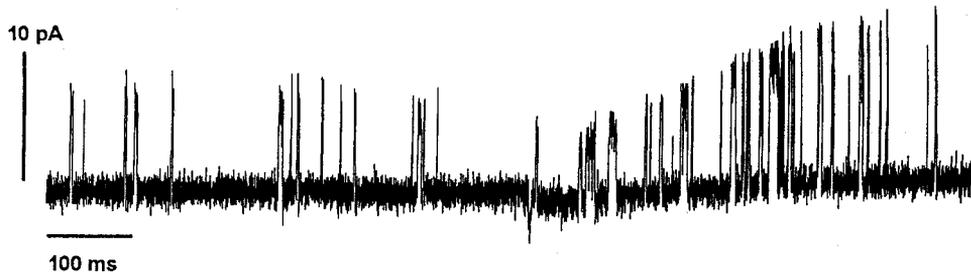
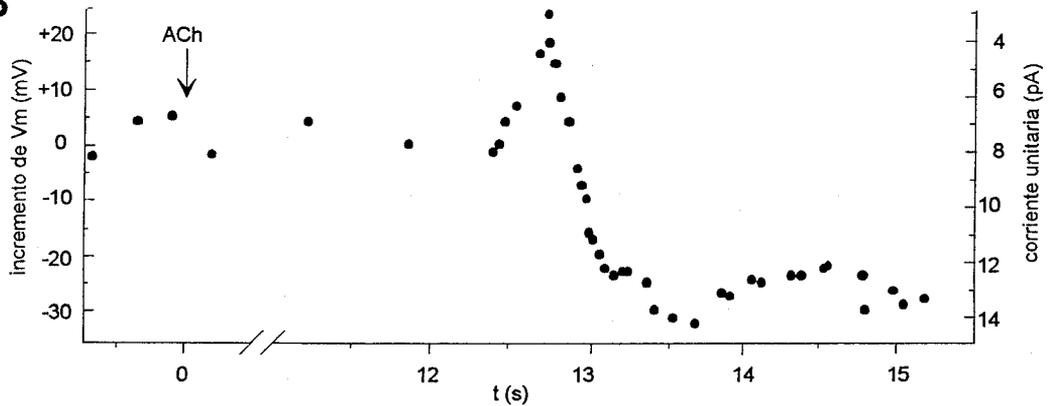
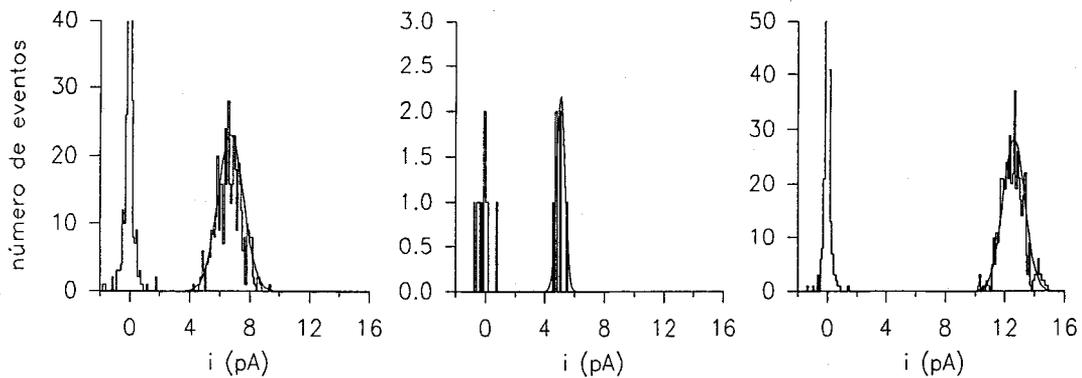
A**B****C**

Figura 68. Efecto de ACh sobre el potencial de membrana monitorizado a través de una $i_{K(Ca)}$ registrada en una microarea de membrana *in situ*, de la misma célula de la figura x. **A.** Registro expandido donde se observa los cambios de amplitud de la corriente unitaria. **B.** Curso temporal de la modificación de la $i_{K(Ca)}$ y su correspondencia con los cambios en el potencial de membrana celular. La relación $i-v$ de la figura x permitió establecer esta correspondencia. El inicio de la aplicación de ACh fue en $t = 0$ s. **C.** Histograma de la distribución de frecuencias de las amplitudes de las corrientes unitarias antes de la aplicación de ACh (panel izquierdo, 6.91 ± 0.96 pA, media \pm desviación estándar) y después (panel medio, 5.29 ± 0.96 pA, y derecho, 12.7 ± 0.73 pA).

Resultados

Los transitorios espontáneos en espiga que pueden ser debidos a la activación/inactivación esporádica de una conductancia en células con una alta resistencia de membrana, fueron disminuyendo progresivamente en amplitud al progresar la despolarización (figuras 64 A, 65 y 70). Esta menor amplitud de las espigas a potenciales más despolarizados, probablemente obedezca al decremento de la resistencia de membrana cuando se activan las conductancias despolarizantes. En células con el medio intracelular intacto (registro de corrientes unitarias *in situ*), se observaron modificaciones de la amplitud de las corrientes a través de canales únicos, compatibles con cambios espontáneos del potencial de membrana. En la Figura 71 se muestran corrientes unitarias de K^+ registradas en un microárea de membrana *in situ*, con al menos dos canales de K^+ de gran conductancia, con una amplitud unitaria de ~ 9 pA a un $V_p = 0$ mV. La probabilidad de apertura (P_a) de estos canales fue muy baja (< 0.1), excepto en intervalos en los que la frecuencia de apertura de los canales aumentó notablemente (brotos).

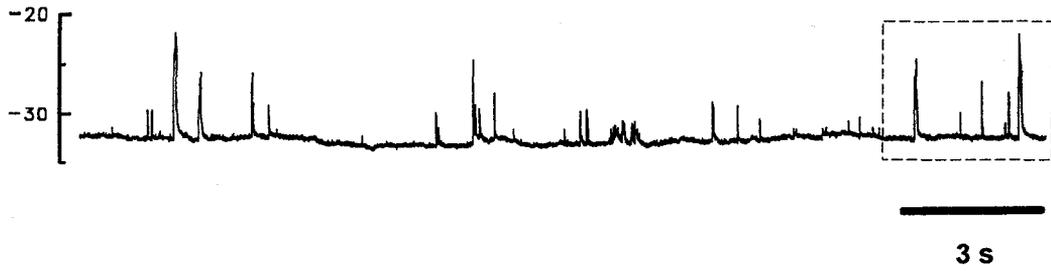
La aparición de los brotes estuvo precedida por inflexiones negativas del nivel de corriente basal, de ~ 2 pA (figura 71). Estas inflexiones negativas tuvieron una duración variable, entre fracciones de segundo y 2-3 segundos. La corriente basal durante las mismas disminuyó progresivamente hasta retornar al nivel inicial.

La amplitud unitaria de las corrientes de K^+ al inicio del brote fue ~ 3.5 pA, menor que en periodos interbrotos. No obstante, la amplitud aumentó progresivamente durante el mismo hasta alcanzar un valor final de ~ 9 pA. La pequeña amplitud de i_K al inicio del brote indica la despolarización del potencial de membrana en ese momento. El aumento progresivo de i_K durante el brote muestra la repolarización progresiva del potencial de membrana hacia su valor de reposo.

Esta secuencia de despolarizaciones de instauración rápida (en pocos milisegundos) seguidas de repolarizaciones más lentas (centenas de milisegundos) con

A

Vm (mV)

**B**

Vm (mV)

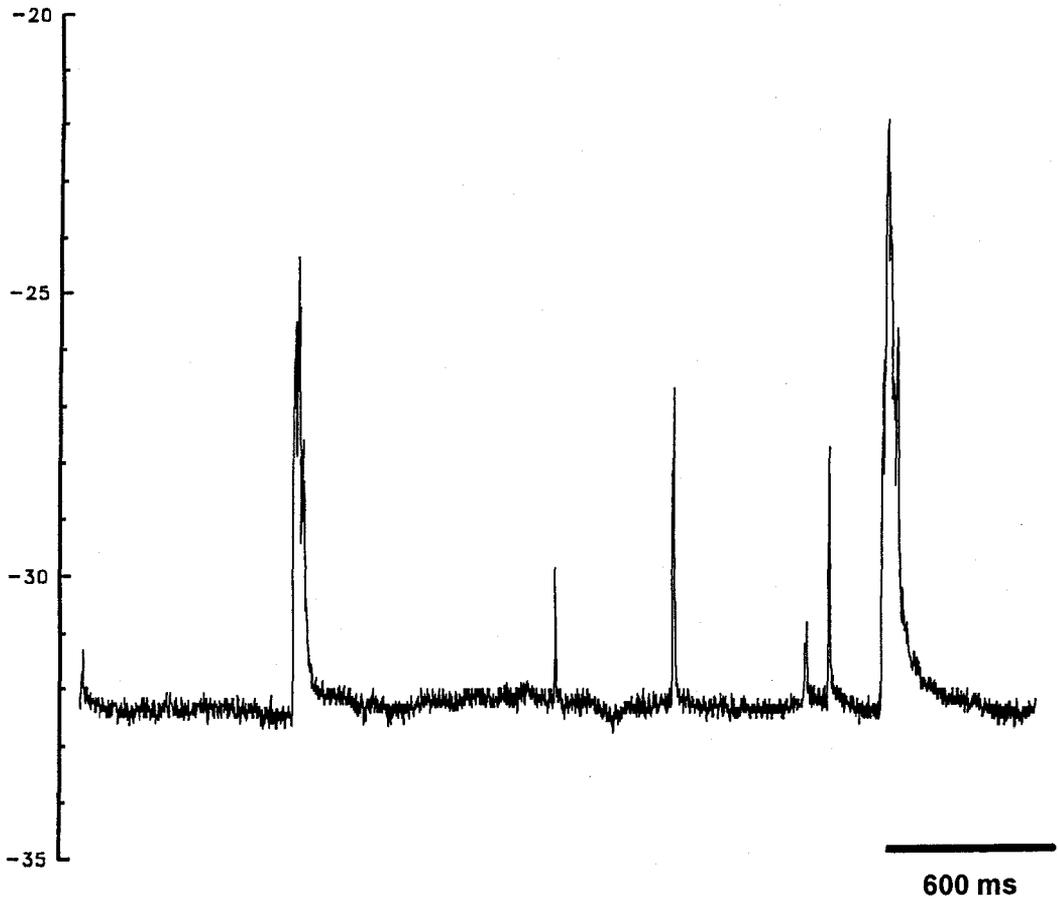


Figura 69. Despolarizaciones transitorias espontaneas en espiga. A. Registro del potencial de membrana en una célula sometida a fijación de corriente con la técnica de *patch-clamp* (parche perforado con nistatina). B. Ampliación del registro mostrado en A enmarcado en líneas discontinuas.

Resultados

un curso temporal monotónico recuerda las espigas de despolarización espontánea observadas en fijación de corriente (figura 69).

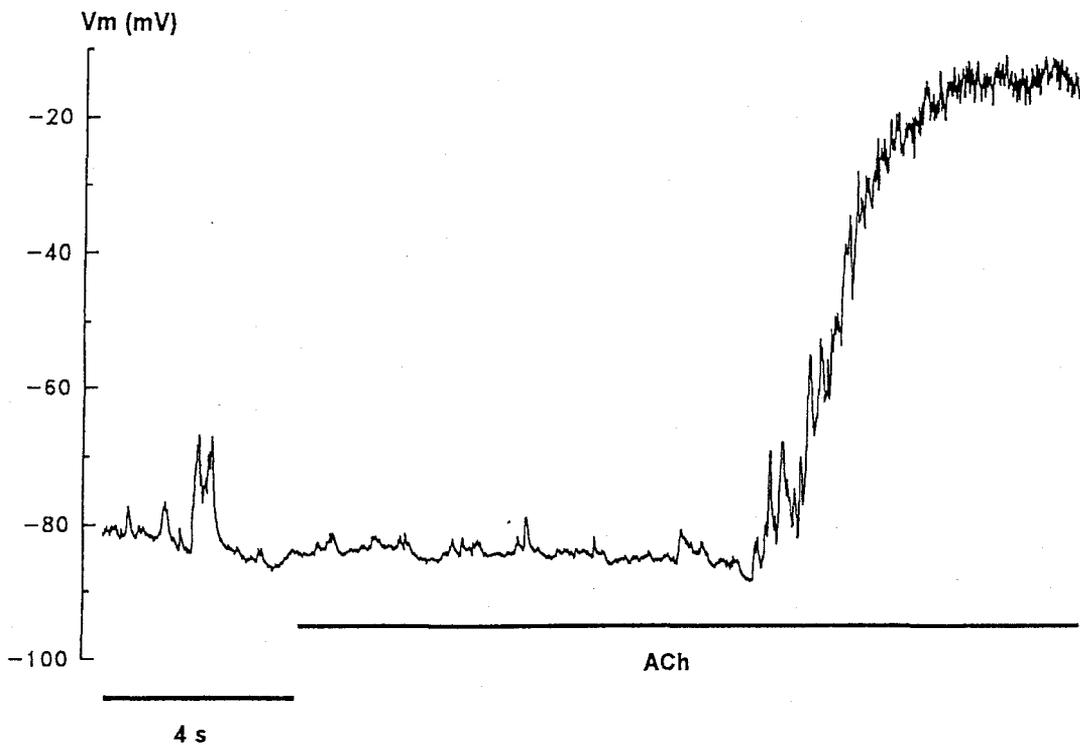


Figura 70. Despolarizaciones transitorias espontáneas e inducidas. Transitorios de despolarización del potencial de membrana espontáneos e inducidos por ACh, 20 μ M, en una célula sometida a fijación de de corriente a través de un parche de membrana perforado con nistatina.

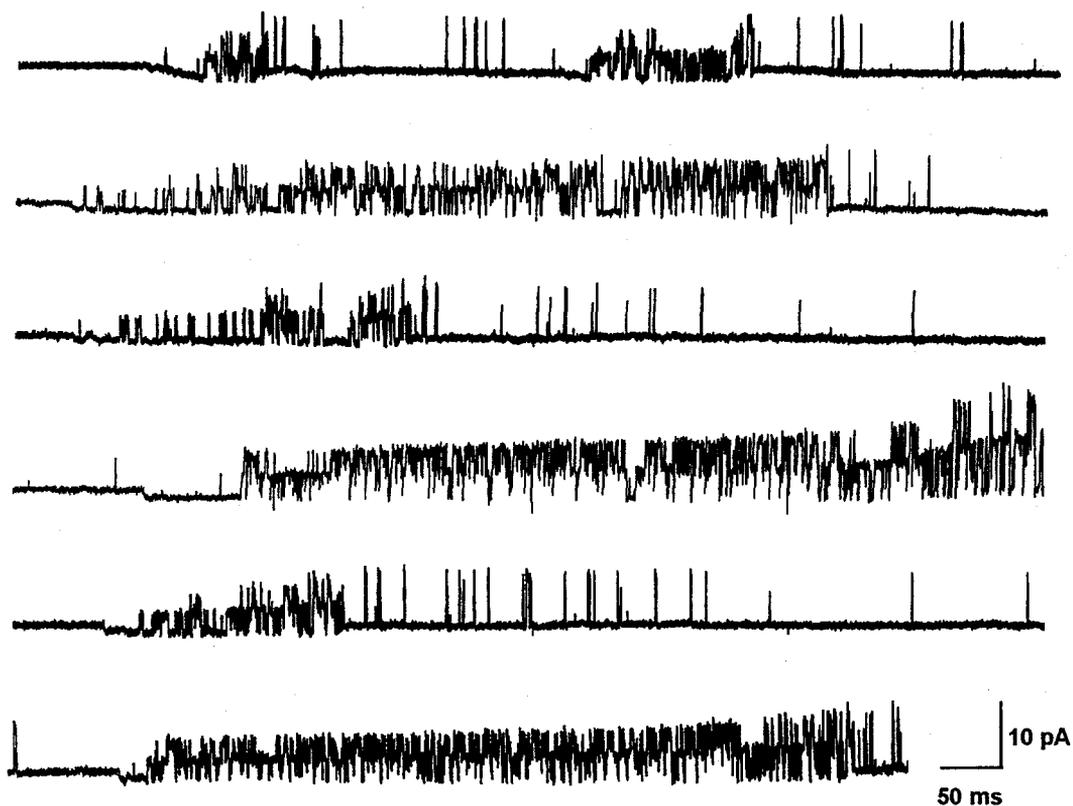


Figura 71. Cambios espontaneos en la amplitud de una corriente de potasio a través de canales únicos. Configuración de *cell-attached*. $V_p = 0$ mV, Ganacia 50 pA/mV, 1 KHz. Solución externa (en mM): 145 ClNa, 10 Cl₂Ca, 10 Hepes, 20 glucosa. Solución en la pipeta (en mM): 140 ClK, 7 Cl₂Mg, 0.35 EGTA-K₂, 0.225 EGTA-Ca, 10 Hepes.

RESULTADOS, SECRECIÓN

5.1 DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE INDOLAMINAS

5.1.1 Registros voltamétricos en poblaciones celulares

Previamente a la medida amperométrica del material secretado por una única célula mediante el detector electroquímico, se midió *in vitro* el potencial de oxidación de la melatonina y algunos metabolitos de la vía de ésta (triptófano y serotonina). Como electrodo se utilizó una fibra de grafito conectada a un convertidor corriente-voltaje y sometida a un potencial creciente en rampa desde 0 a 800 mV. Los compuesto indólicos exaninados se disolvieron en solución salina y la corrientes de oxidación resultantes fueron registradas como se ilustra en la figura 26. El potencial de oxidación (máxima corriente) para el triptófano y la serotonina fue 800 mV (Figura 72 A y C) mientras que el de la serotonina fue de 440 mV (figura 72 B)

Así mismo, se registraron las corrientes resultantes de la oxidación de sustancias

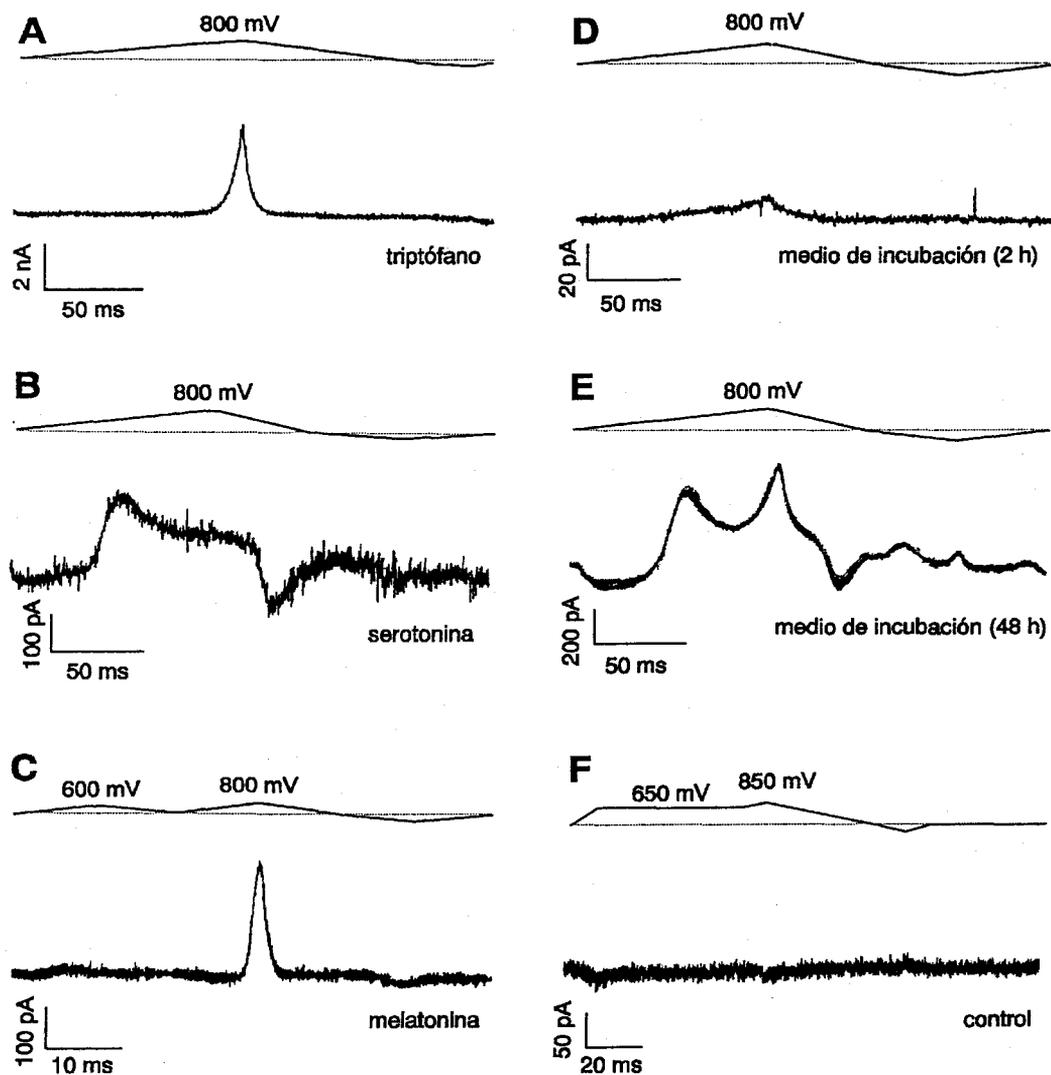


Figura 72. Corrientes de oxidación de indolaminas de síntesis y secretadas por pinealocitos. Las corrientes fueron registradas con un electrodo de fibra de grafito conectado a un convertidor I/V. **A.** El pico de oxidación del triptófano se produjo a un potencial de +800 mV. **B.** La 5-hidroxitriptamina (serotonina) fue oxidada a un potencial de +440 mV. **C.** La oxidación de la melatonina fue a un potencial de ~ +800 mV. A un potencial de +600 mV no se detectó. **D.** A las 2 h de incubación de pinealocitos se detectaba en el medio de cultivo un pico incipiente de corriente de oxidación a ~ +800 mV. **E.** En la corriente de oxidación del medio de cultivo tras 48 h de incubación de pinealocitos se distinguen dos picos, a +440 y ~ +800 mV. **F.** En medio de cultivo control no se registró corriente alguna de oxidación, a distintos potenciales.

Resultados

contenidas en el medio de cultivo a distintos tiempos de incubación con las células. Alícuotas del medio de cultivo se añadieron a la cámara de registro. Como se observa en la parte derecha de la figura 72, después de 2 horas de incubación en el medio se detectó un pico incipiente de oxidación a 800 mV (figura 72 D). A las 48 horas, sin embargo, en el medio de incubación se detectaron dos picos de corrientes de oxidación, uno a un potencial de 800 mV y otro a 440 mV (figura 72 E). En ausencia de células, en el medio de cultivo no se evidenció ninguna sustancia detectable con métodos electroquímicos (figura 72 F).

El perfil de la corriente de oxidación registrada en el medio donde se incubaron pinealocitos por 48 horas fue muy similar al de la oxidación conjunta de serotonina y de otra indolamina con un potencial de oxidación próximo a los 800 mV, p.e. melatonina (figura x E). Así, se puso de manifiesto la presencia en el medio de al menos dos sustancias sintetizadas por las células pineales. Los potenciales de oxidación de estas sustancias sugerían que podían ser serotonina y melatonina las responsables de las corrientes de oxidación registradas en sobrenadantes de 48 horas de incubación.

5.1.2. Registros amperométricos en célula única

La liberación de sustancias de células únicas se detectaron electroquímicamente con un electrodo de fibra de carbono, conectado a un convertidor I/V y colocado a menos de 1 μm de la superficie celular (figura 24). Las sustancias liberadas fueron registradas como corrientes amperométricas transitorias en forma de espigas.

Aunque, el registro de transientes amperométricos en células pineales no pudo ser obtenido de forma sistemática, no obstante, se registraron en algunas células señales amperométricas de características similares a las observadas en otras células secretoras (células cromafines, cebadas y glómicas)

Las señales amperométricas registradas fueron únicas y de gran amplitud (figura

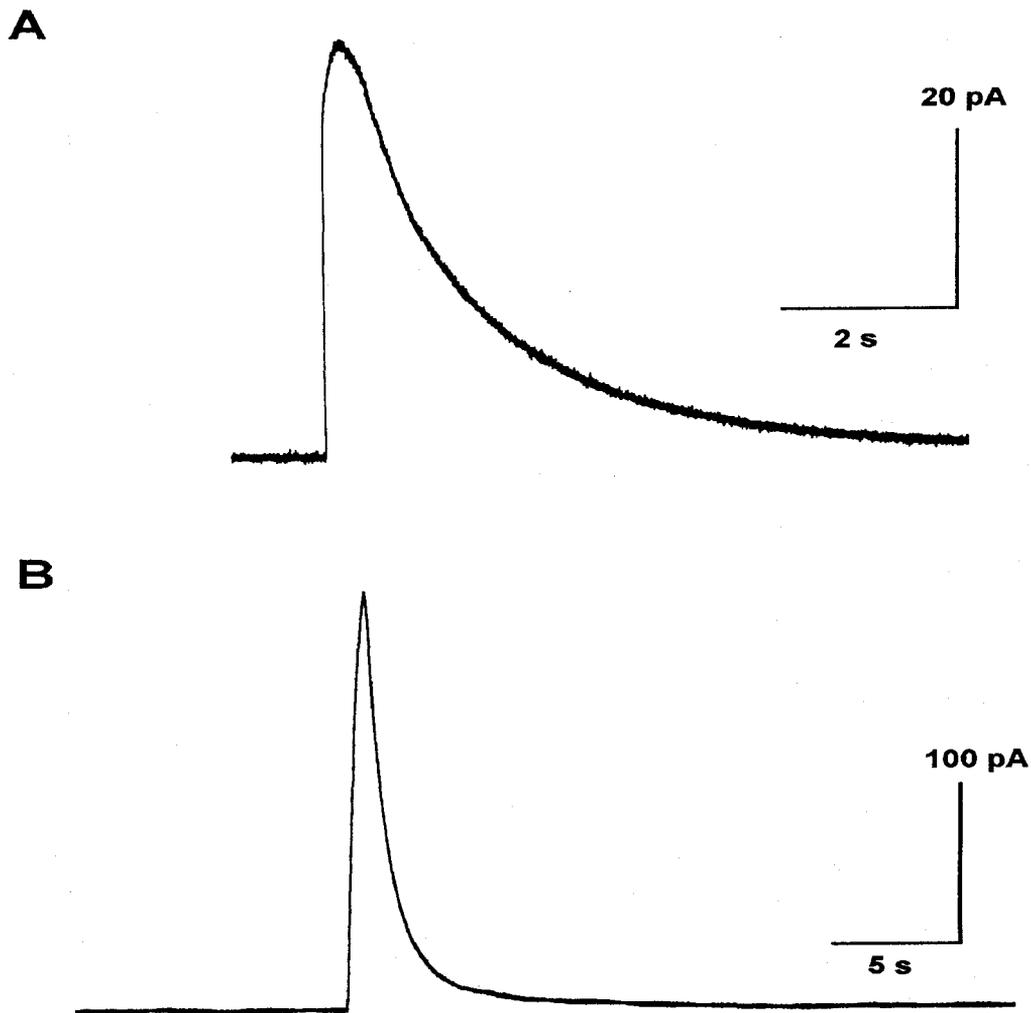


Figura 73. Corrientes amperométricas registradas con electrodos de fibra de grafito. **A.** Corriente obtenida con un electrodo de grafito y polietileno sin aplicación de agonista a un potencial de 740 mV. La fase de subida fue de 26 ms y el ancho 1/2 1200 ms. **B.** Corriente inducida tras la aplicación a la célula de Ach. El electrodo estuvo fabricado de grafito y vidrio. El potencial de oxidación se impuso a 600 mV. La fase de subida fue 560 ms y el ancho 1/2 1120 ms.

Resultados

73 y 74). Tuvieron un ancho de espiga a la mitad de la amplitud que variaba entre 200 y 1200 milisegundos. Algunos transientes fueron precedidos por una corriente más pequeña y lenta que podría representar la liberación a través de un poro de fusión excitotóxico parcialmente abierto, como ha sido descrito en otros tipos celulares y que se ha denominado *foof* (Chow, von Rüden y Neher, 1992; Álvarez de Toledo, Fernández-Chacón y Fernández, 1993).

En la Figura 74, se muestra el registro de una señal de liberación única inducida en una célula tras 3 minutos de aplicación de ACh 20 μ M. Esta señal fue precedida de una corriente lenta de pequeña amplitud (*foof*), que representó un 6% de la carga total del transitorio amperométrico. Otras veces la señal amperométrica fue registrada sin estímulo previo, de forma espontánea (Figura 73 A).

Aunque de las características de la señal amperométrica no se pudo identificar qué metabolito de la vía de síntesis de melatonina en pinealocitos fue el responsable de la misma, el potencial de oxidación de las sustancias detectadas, ≤ 600 mV, sugiere que no se trata de melatonina, aunque es compatible con la liberación de serotonina (véase más adelante DISCUSIÓN)

5.2. REGISTRO DE CAPACIDAD ELÉCTRICA

5.2.1. Cambios de la capacidad eléctrica de la membrana celular

Con el objeto de confirmar si en los pinealocitos se pudiese liberar alguna de sus hormonas por exocitosis, como apuntaban los resultados obtenidos con amperometría se monitorizó la capacidad eléctrica de la membrana por ser éste un parámetro directamente proporcional a la superficie celular. Como se muestra a continuación,

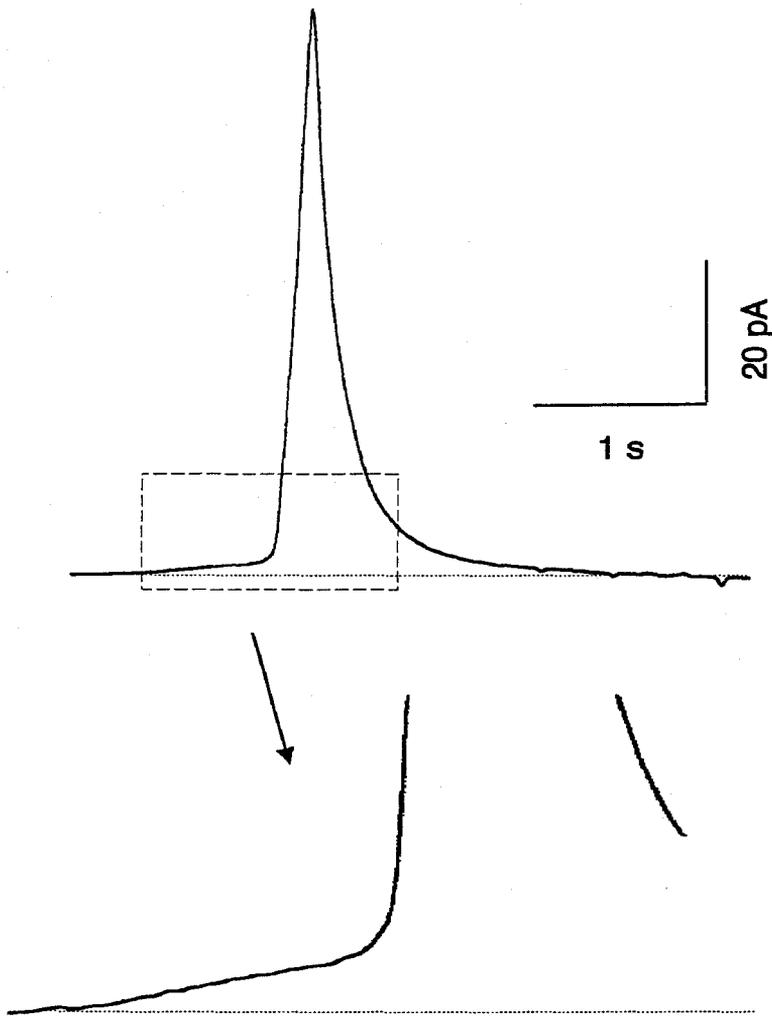


Figura 74. Tras la aplicación de ACh, 20 μ M se registró en una célula no dializada un transitorio amperométrico a un potencial de 600 mV. Esta corriente estuvo precedida por una más pequeña y lenta que representó un 6 % de la carga neta de la corriente total. La línea de puntos indica el nivel de cero corriente.

Resultados

cuando las células se dializaron con una solución de alto Ca^{2+} ($\geq 1\mu\text{M}$) se observaron cambios de capacidad.

En la Figura 75 se muestra un incremento de la capacidad eléctrica registrada en una célula sometida a fijación de voltaje en la configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp*. La célula fue dializada con una solución de alto Ca^{2+} ($1.6\mu\text{M}$) y mantenida a un potencial de membrana que variaba sinusoidalmente en torno a los $-50 \pm 27\text{ mV}$. La capacidad inicial de 7.5 pF experimentó un incremento sigmoidal de un 36% , que se desarrolló lentamente en 25 s , tras $xx\text{ s}$ de diálisis celular.

Simultáneamente a la capacidad eléctrica, se registró la conductancia de membrana (G_m), que se mantuvo constante, y la conductancia en serie (G_s). No obstante, el registro de G_s se incrementó transitoriamente en 7 nS de modo paralelo a los cambios de capacidad. Probablemente, este aumento de G_s fuera reflejo o proyección de los cambios de capacidad sobre el eje real de la impedancia de la membrana celular. Sin embargo, cambios en la conductancia en serie de 10 nS , inducidos interponiendo en serie una resistencia de $100\text{ M}\Omega$ entre la solución del baño y la tierra eléctrica, no originaron proyección sobre el registro de capacidad (ver figura 75).

En otras células, se detectaron saltos discretos de capacidad como se ilustra en la Figura 76. Estos saltos tuvieron una amplitud en torno a los 100 fF (véase pulso de calibración en figura 76 A) y escasa a nula proyección sobre la impedancia resistiva en serie de la membrana

También se han registrado decrementos de la capacidad eléctrica de membrana graduales y discretos, generalmente posteriores a incrementos previos (figura 76 C y D), que sugieren la existencia de fenómenos endocíticos de membrana (véase más adelante).

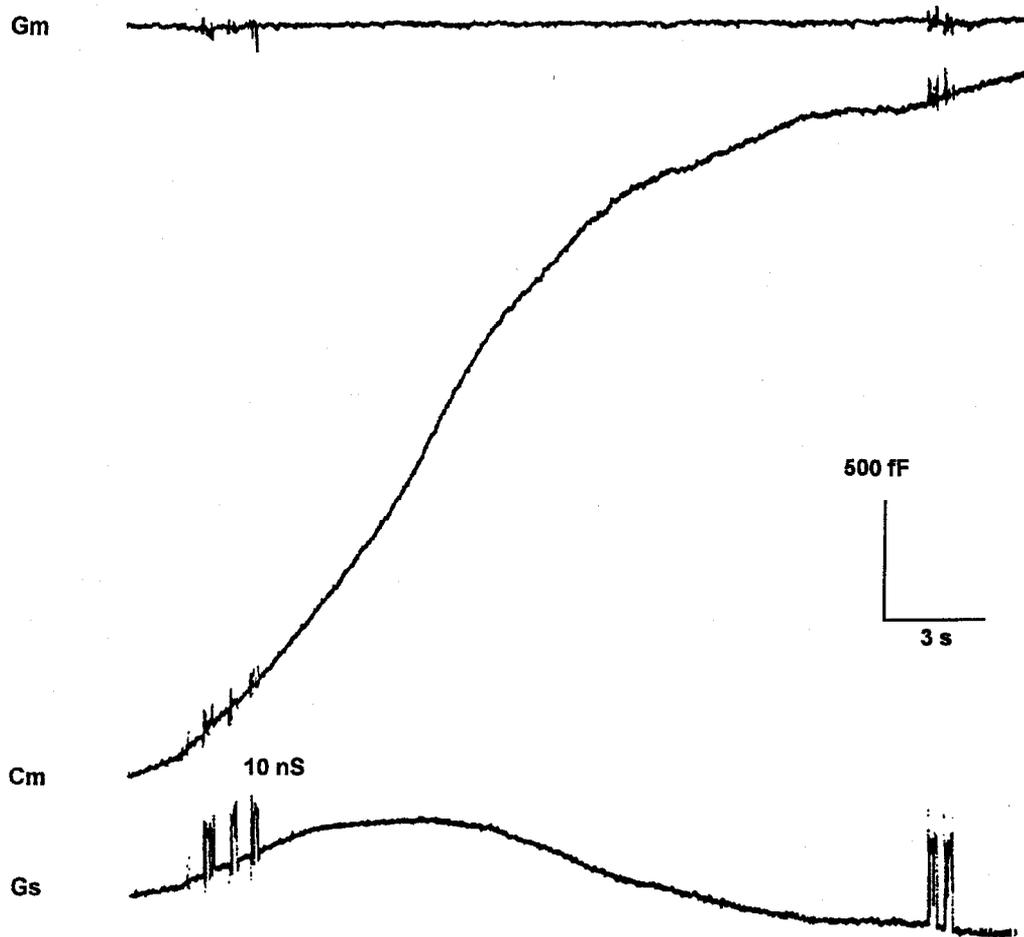


Figura 75. Registro simultaneo de conductancia de membrana (Gm), capacidad de membrana (Cm) y conductancia en serie (Gs). Nueve minutos después de comenzar la diálisis de la célula con una solución de alto Ca^{2+} , $1.6 \mu\text{M}$, se registró un incremento gradual de la capacidad en un 36% desde un valor inicial de 7.5 pF . No se añadieron nucleótidos a la solución interna.

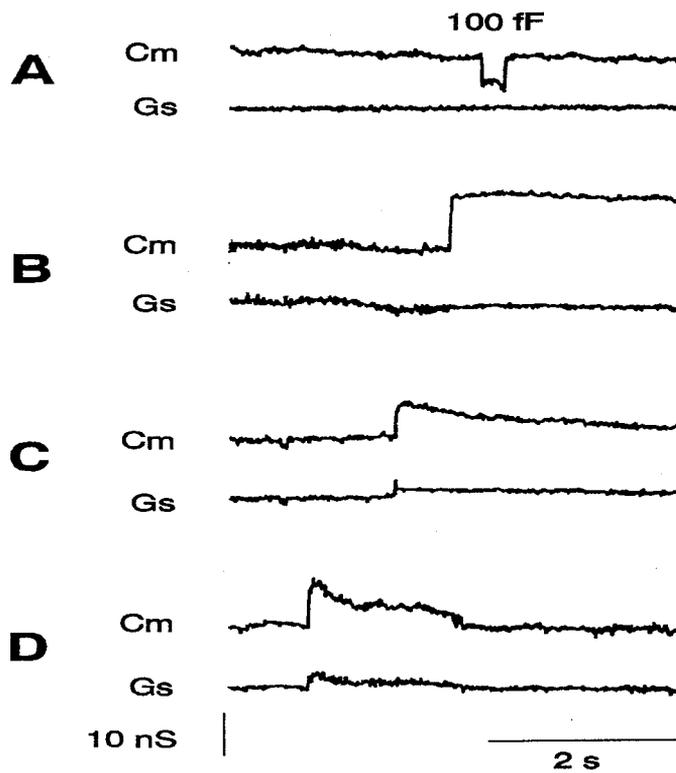


Figura 76. Saltos de capacidad en una célula dializada. **A.** Trazo de calibración de corriente capacitativa (Cm) de 100 fF en fase de $\sim 90^\circ$ con la corriente resistiva (Gs). **B.** salto de capacidad irreversible. **C.** Incremento súbito de capacidad seguido de un decremento lento. **D.** Incremento y decremento súbito de capacidad. La $[Ca^{2+}]$ en la pipeta fue 100 nM. Se añadieron nucleótidos a la solución interna (ATP-Mg, 400 μ M, y GTP γ S, 100 μ M)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han empleado distintas técnicas con el objetivo de estudiar los mecanismos implicados en las diferentes etapas del proceso de acoplamiento estímulo-secreción en pinealocitos.

Por un lado, se ha utilizado microfluorometría para monitorizar la respuesta celular (cambios en la $[Ca^{2+}]_i$) ante estímulos adrenérgicos y colinérgicos. Se han estudiado en detalle el patrón de la señal de Ca^{2+} (procedencia del Ca^{2+} , cinética de la señal, etc) en respuesta a ambos estímulos, así como, los tipos de receptores que la median. Especial atención se ha prestado al análisis de la liberación selectiva de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares inducida por uno u otro agonista, cuyo origen se discute el apartado 6.1.8.

Por otro lado, se ha estudiado el efecto de los estímulos adrenérgicos y colinérgicos sobre las conductancias de la membrana. Con este objetivo, se ha utilizado la técnica de "patch clamp" en sus distintas configuraciones, para registrar tanto la activación de

Discusión

corrientes iónicas totales, como corrientes a través de canales individuales, o los cambios de potencial de membrana en células no dializadas y en células parcialmente dializadas (microáreas perforadas con nistatina). Como resultado, se han identificado dos conductancias (g_{Cl} y g_K), cuya activación es Ca^{2+} -dependiente, y cuyo significado funcional se discute en el apartado 6.2.4.

Por último, se han utilizado dos técnicas de gran resolución para estudiar la secreción: la detección electroquímica de sustancias secretadas por la célula mediante voltametría/amperometría y el registro de la capacidad eléctrica como medida de los cambios en la superficie de la membrana plasmática. Los datos obtenidos con ambas técnicas son de gran interés y abren la puerta a una investigación mas profunda que permita caracterizar los mecanismos de secreción en estas células y estudiar su regulación.

6.1 LA SEÑAL DE Ca^{2+}

En la mayor parte de las células, tanto en las eléctricamente excitables como en las no excitables, la señal de Ca^{2+} tiene un componente que se debe a liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares. No obstante, en las células excitables la salida de Ca^{2+} de los reservorios tiene lugar, preferentemente, por un mecanismo de *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* o CICR (del inglés "calcium-induced calcium release", Fabiato, 1983) a través de canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina (McFerson y Campbell, 1993) y cuyo ligando fisiológico se cree que es el Ca^{2+} (Figura 77 B). En células no excitables, sin embargo, la liberación de Ca^{2+} está mediada, preferentemente, a través de un mensajero difusible, inositol 1,4,5-trifosfato o IP_3 (Berridge, 1993), que actúa sobre canales de Ca^{2+} selectivos localizados en

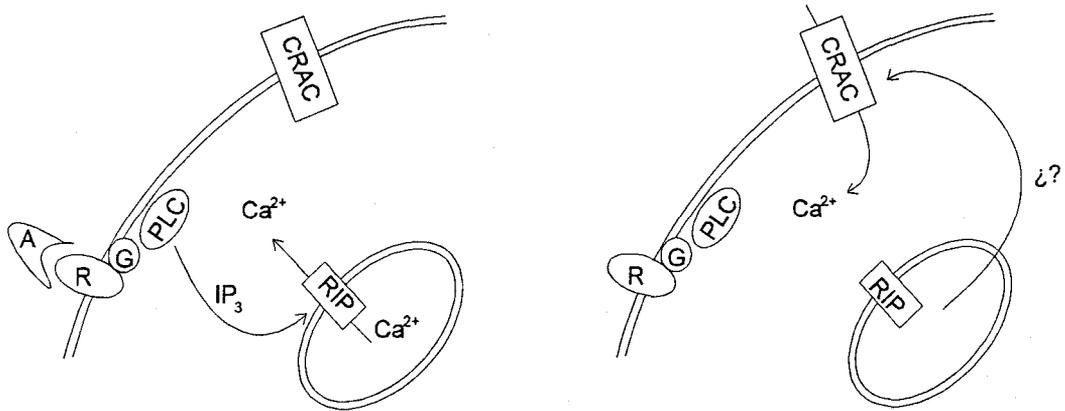
la membrana de almacenes intracelulares (Ferris y Snyder, 1992) (figura 77 A). Sin embargo, ambos tipos de receptores pueden coexistir en la misma célula e incluso en el mismo reservorios (Stauderman y Pruss, 1989; Clementi y col, 1992).

De forma similar, en células excitables y no excitables, existe un componente de la señal de Ca^{2+} que se debe a la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo. Existen múltiples vías de entrada de Ca^{2+} en las células: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (figura 77 A), canales no dependientes de voltaje regulados por receptor (p.e. receptor nicotínico), activados por segundos mensajeros (p.e., IP_3) o activados por el vaciamiento de reservorios intracelulares. En este último caso, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular se produce con posterioridad a la liberación de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares (*mecanismo capacitativo* de entrada de Ca^{2+} , Putney, 1990). La corriente iónica asociada a esta entrada de Ca^{2+} capacitiva ha sido caracterizada a nivel electrofisiológico y se la denomina I_{CRAC} ("calcium release activated current", I_{CRAC} , Hoth y Penner, 1992) (figura 77 B).

La caracterización de los mecanismos responsables de la generación de la señal de Ca^{2+} es importante desde el punto de vista funcional. En células con liberación de Ca^{2+} tipo CICR, ésta amplifica la intensidad y la distribución espacial de la señal de Ca^{2+} , para inducir respuestas rápidas, por ejemplo, secreción por exocitosis. En células con entrada de Ca^{2+} capacitativa, ésta amplifica fundamentalmente la duración de la señal de Ca^{2+} , proporcionando Ca^{2+} para respuestas mantenidas o tónicas, como por ejemplo la síntesis bioquímica de una hormona, o el mantenimiento del potencial de membrana de células fotorreceptoras (Hardie y Mincke, 1992).

Los pinealocitos no parecen ser células excitables, carecen de canales de Na^+ dependientes de potencial y poseen un número pequeño de canales de Ca^{2+} voltaje-

A



B

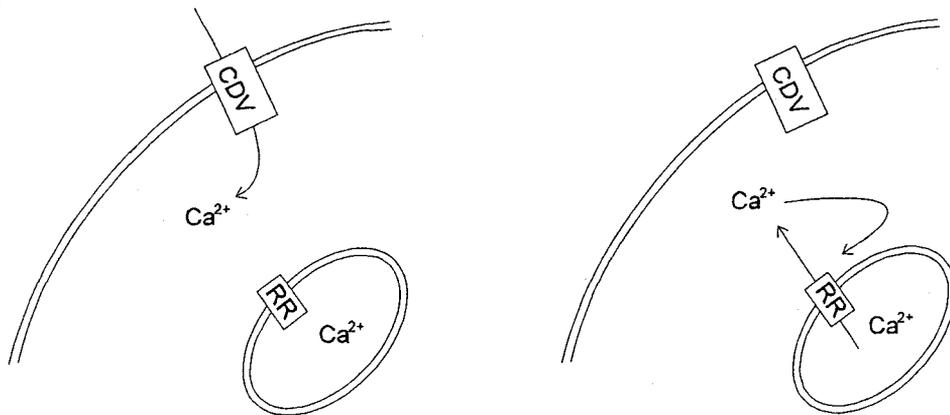


Figura 77. Patrones de la señal de Ca²⁺ en células excitables y no excitables. **A.** En células inexcitables, la unión del agonista (A) a su receptor (R) de membrana, a través de una proteína G (G), activa la fosfolipasa C (PLC) que degrada el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, y libera el segundo mensajero IP₃. El IP₃ activa el receptor de IP₃ (RIP) y libera calcio de reservorios intracelulares (panel izquierdo). El vaciamiento (panel derecho) genera una señal que activa la entrada de Ca²⁺ capacitativa (CRAC, "calcium release activated-current"). **B.** En células eléctricamente excitables, el patrón de la señal de Ca²⁺ es más variable. Generalmente, la entrada de Ca²⁺ tiene lugar a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (CDV). Este Ca²⁺ puede inducir liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares (CICR) activando el receptor de rianodina (RR).

dependientes. Por otro lado, poseen receptores metabotrópicos acoplados a la vía del inositol fosfato (véase mas adelante) y no liberan Ca^{2+} en presencia de cafeína.

6.1.1 El patrón de la señal de calcio inducida por NA

Registros de Ca^{2+} en suspensiones de células pineales, empleando como fluoróforo quin2, han mostrado que NA induce entrada de Ca^{2+} del medio externo, y que este efecto está mediado por la activación de receptores α_1 -adrenérgicos (Sugden y col., 1987).

En el presente trabajo, se ha corroborado que el incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por NA está mediado a través de la activación de receptores α_1 -adrenérgicos y que se produce entrada de Ca^{2+} desde el medio externo. Sin embargo, la señal de Ca^{2+} no sólo se debe a la entrada de Ca^{2+} extracelular sino a la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares como lo demuestra el hecho de que NA es capaz de producir una señal de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} externo. Probablemente, en el estudio de Sugden y col. no se puso de manifiesto la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares inducida por NA, debido a la baja resolución temporal de las medidas de Ca^{2+} realizadas en poblaciones celulares.

La vía de entrada del Ca^{2+} en la célula desde el medio extracelular en respuesta al estímulo adrenérgico no se ha caracterizado hasta el momento. Ésta puede ser capacitativa, del tipo I_{CRAC} , no obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la entrada de Ca^{2+} externo sea a través de canales activados por segundos mensajeros con una cinética de activación relativamente lenta y mantenida.

6.1.2. El patrón de la señal de calcio inducida por ACh

El efecto de la ACh o CCh sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en pinealocitos no ha sido descrito con anterioridad. Sin embargo, en estas células se ha documentado la existencia de receptores

Discusión

colinérgicos del tipo muscarínico, posiblemente implicados en la regulación de la síntesis de indolaminas (Finocchiaro y col., 1990; Finocchiaro y Téllez-Iñón, 1991).

Al igual que la estimulación adrenérgica, aunque con un curso temporal muy distinto, la activación de los receptores muscarínicos induce liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Sin embargo, ambos componentes no se suelen distinguir en los registros debido, probablemente, a su superposición en el tiempo.

Una posibilidad es que la entrada de Ca^{2+} inducida por ACh sea a través de canales activados por segundos mensajeros y ocurra simultáneamente a la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, o que la entrada de Ca^{2+} sea de tipo capacitativo pero con una cinética de activación más rápida que para la inducida por NA.

6.1.3. El significado funcional de la señal de Ca^{2+} inducida por NA

Aunque, la función del incremento de Ca^{2+} citosólico en pinealocitos no está totalmente definida, se sabe que el incremento del AMPc y GMPc inducido por NA está mediado por una proteína quinasa C de un modo dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

NA activa en las células pineales de mamíferos el receptor α_1 -adrenérgico, el cual desencadena la hidrólisis de fosfatidilinositol e incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular (figura 28). La activación del receptor α_1 -adrenérgico, que por sí mismo no tiene efecto sobre la adenilato ciclasa, potencia dramáticamente (30-100 veces) la síntesis de AMPc y GMPc mediada por la activación de adrenoreceptores β . Esta potenciación es reproducida e inhibida cuando se induce y previene, respectivamente, la elevación del Ca^{2+} citosólico (Sugden y cols., 1986), y está mediada por una proteína quinasa C (PKC). El incremento del Ca^{2+} citosólico es suficiente para que se produzca la activación de la PKC (Ho y col, 1988).

Así pues, la señal de Ca^{2+} inducida por estimulación adrenérgica dado que no es de gran amplitud pero sí de gran duración podría estar implicada en la elevación mantenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, necesaria para la síntesis nocturna de melatonina.

6.1.4. El significado funcional de la señal de Ca^{2+} inducida por ACh

El significado funcional de los incrementos de Ca^{2+} mediados por la activación de receptores muscarínicos en la pineal no se conoce. Pero debido a que la señal de Ca^{2+} es de gran amplitud y corta duración, un papel probable podría ser desencadenar la secreción de serotonina, proceso que recientemente se ha mostrado mediado por receptores muscarínicos en estas células (Finocchiaro y col., 1990; Finocchiaro y Téllez-Iñón, 1991).

6.1.5 Segundos mensajeros intracelulares

Los posibles mensajeros que activan la liberación de Ca^{2+} en las células pineales no han sido identificados todavía, aunque trabajos previos han mostrado que tanto la activación de los receptores adrenérgicos como colinérgicos desencadenan la hidrólisis del fosfatidilinositol en estas células (Smith y col., 1979; Hauser y col., 1983; Zatz, 1985; Sugden y col., 1987; Laitinen, Torda y Saavedra, 1989a). Sin embargo, la activación concomitante de otros, aún no identificados, segundos mensajeros no puede ser descartada. Por ejemplo, en células acinares lagrimales la estimulación α -adrenérgica induce liberación de almacenes de Ca^{2+} a través de receptores sensibles a rianodina posiblemente mediada por ADP ribosa cíclica (Gromada, Jørgensen y Dissing, 1995).

La formación de fosfoinositol, subsiguiente a estimulación muscarínica, es insensible a toxina *pertussis* (PTX) en las células pineales (Laitinen y col., 1989b), al igual que las señales de Ca^{2+} inducidas por agonistas muscarínicos y α_1 -adrenérgicos en nuestros



experimentos.

6.1.6 Liberación de calcio inducida por calcio (CICR)

Actualmente se sabe que la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares se produce a través de dos mecanismos distintos: activación de los receptores de rianodina a través de CICR o activación de receptores de IP_3 (Berridge, 1993). Sin embargo, puede que ambos mecanismos no sean tan distintos, lo que no sorprende a la vista de la homología entre el receptor de IP_3 y el de rianodina (Mignery y cols, 1989). Por ejemplo, en células excitables el Ca^{2+} no es el único agonista fisiológico del receptor de rianodina; la adenosina difosfato ribosa cíclica, ADPRc, puede funcionar como un mensajero difusible, pues incrementa la probabilidad de apertura de este canal. De forma alternativa, también se ha demostrado que en células no excitables el IP_3 no es agonista exclusivo del receptor sensible a IP_3 sino que el Ca^{2+} puede mediar un mecanismo de CICR, ya que se ha demostrado una cooperación positiva en la unión del Ca^{2+} y el 1,4,5 fosfoinositol al receptor de IP_3 (Missiaen y cols, 1991).

6.1.7. El decremento de la señal de Ca^{2+}

En pinealocitos, aplicaciones repetidas de agonista desensibilizan, probablemente, el receptor de membrana, la vía de segundos mensajeros asociados a estimulaciones adrenérgicas y muscarínicas, o los propios canales de Ca^{2+} de los reservorios, como previamente se ha descrito en otras células (Tan y Marty, 1991). La desensibilización de receptores acoplados a la hidrólisis del fosfatidilinositol puede ser debida, al menos en parte, a una retroalimentación negativa mediada por la proteína quinasa C (Ho y col., 1988).

Sin embargo, la disminución de la señal de Ca^{2+} observada en las células pineales

con aplicaciones sucesivas de agonista (figura 41), no puede ser explicada por simple desensibilización sino por vaciamiento progresivo de los almacenes. Esta afirmación está basada en la existencia de *señales de Ca²⁺ de relleno* al pasar de solución sin Ca²⁺ a solución con Ca²⁺ (figura 40), y en los siguientes hallazgos experimentales obtenidos con estimulaciones sucesivas de agonista:

1. El vaciamiento es un fenómeno mucho más rápido que la desensibilización ya que I) la constante de tiempo del decaimiento de las amplitudes de los transitorios de Ca²⁺ es aproximadamente tres veces más rápida en 0 Ca²⁺ que en solución control (figuras 42 A y D; 43 A y D). II) el incremento de $t_{1/2}$ es mucho mayor en ausencia de Ca²⁺ que en presencia (figuras 42 C y F; 43 C y F).

2. Después de la extinción de la señal de liberación de Ca²⁺ inducida por agonista, las respuestas pudieron ser recuperadas tras una breve permanencia de las células en una solución con Ca²⁺, pero no si se mantenían en solución de 0 Ca²⁺ (figura 44).

3. El contenido de Ca²⁺ de los reservorios decreció importantemente después de varias aplicaciones de PE, como demuestran los experimentos con ionomicina (figura 46).

6.1.8. Dos almacenes funcionalmente distintos

Probablemente, el mayor hallazgo de este trabajo, en lo que a señal de Ca²⁺ inducida por agonista se refiere, haya sido que la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares puede ser inducida selectivamente por distintos agonista. Los experimentos ponen de manifiesto que la estimulación muscarínica induce el vaciamiento de unos almacenes pero no de otros, puesto que la estimulación adrenérgica ulterior es capaz de inducir liberación de unos almacenes acoplados selectivamente a estimulación adrenérgica. Sin embargo, la activación de los receptores adrenérgicos es suficiente para vaciar todos los reservorios. Es

Discusión

decir, la activación de los receptores muscarínicos puede liberar Ca^{2+} de los almacenes asociados a estimulación muscarínica solamente. En cambio, la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos vaciaría ambos almacenes, asociados a estimulación muscarínica y específicamente adrenérgica.

Sin embargo, ni los almacenes asociados a agonistas muscarínicos ni los estimulados específicamente por agonistas adrenérgicos son sensibles a cafeína (ni probablemente a rianodina, como sugieren experimentos preliminares), indicando que ambos reservorios podrían estar activados por el mismo segundo mensajero, IP_3 . Así pues, estos experimentos demuestran que la activación muscarínica y α_1 -adrenérgica induce selectivamente liberación de Ca^{2+} de dos almacenes intracelulares, insensibles a cafeína, y funcionalmente distintos.

Una respuesta similar ha sido descrita en ovocitos de *Xenopus* donde el almacén asociado a la respuesta muscarínica es un almacén distinto, al menos funcionalmente, del acoplado a receptores de hormona liberadora de tirotropina (TRH), el cual también utiliza IP_3 como segundo mensajero (Shapira y col., 1990). También ha sido demostrado en ovocitos que tras el vaciamiento del almacén de Ca^{2+} acoplado a ACh, IP_3 todavía podía inducir la liberación de Ca^{2+} de otros almacenes (Goldberg, Shapira y Oron, 1992).

6.1.9 Modelos de liberación selectiva de Ca^{2+} de almacenes intracelulares

La existencia de dos almacenes de Ca^{2+} funcionalmente distintos podría ser debida a varias situaciones (Figura 79).

6.1.9.1. Liberación cuántica de Ca^{2+} de almacenes intracelulares

Una posibilidad es que concentraciones bajas de mensajero vacíen solamente una

fracción de los almacenes de Ca^{2+} , mientras que concentraciones mayores vacíen la totalidad de los reservorios (figura 79 A). De acuerdo con esta hipótesis, en células pineales, la estimulación muscarínica produciría menos mensajero que la estimulación α_1 -adrenérgica, y sólo se obtendría respuestas a ambos agonistas cuando los receptores muscarínicos fuesen activados en primer lugar. Por otro lado, cuando los receptores α_1 -adrenérgicos fueran estimulados en primera instancia, la liberación de calcio no tendría lugar debido a que los almacenes de Ca^{2+} estarían vacíos. En este modelo, se supone implícitamente la existencia de una población heterogénea de canales para la liberación de Ca^{2+} , que difieren en su sensibilidad al segundo mensajero.

En apoyo de la mencionada hipótesis, ha sido descrita en trabajos previos la liberación cuántica de Ca^{2+} de almacenes funcionalmente diferentes. La liberación cuántica de Ca^{2+} de almacenes intracelulares se ha descrito tanto para almacenes sensibles a IP_3 como a cafeína/rianodina (Muallem, Pandol, y Beeker, 1989; Meyer y Stryer, 1990; Parker e Ivorra, 1990; Ferris y col., 1992; Cheek y col. 1993, Cheek y col., 1994).

6.1.9.2. Coexistencia de distintos canales de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares

Otra posibilidad es la coexistencia en la misma célula de distintos tipos de canales de liberación de Ca^{2+} (figura 79 B). Se ha descrito en muchos tipos celulares la coexistencia tanto de receptores de IP_3 como de rianodina, sensibles a cafeína (Fasolato y col., 1991). Aunque en células pineales la cafeína no liberó Ca^{2+} de almacenes intracelulares y, por tanto, hace poco probable esta hipótesis, recientemente se ha descrito la existencia de un nuevo tipo de receptor de rianodina insensible a cafeína (Giannini y col., 1992).

Siguiendo la hipótesis de la coexistencia de receptores de IP_3 y rianodina en la célula

Discusión

pineal, la activación de receptores muscarínicos induciría la activación de los receptores de IP_3 o de rianodina mientras que la estimulación adrenérgica induciría la de ambos, similarmente a lo que ocurre en células acinares lagrimales. La activación del almacén sensible a rianodina también podría estar asociada a la del reservorio sensible a IP_3 por un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Stauderman, McKinney, y Murawsky, 1991). Sin embargo, en experimentos preliminares la rianodina no indujo señal de Ca^{2+} ni evitó el desarrollo de la respuesta inducida por ACh o PE en células pineales (datos no mostrados).

6.1.9.3. Colocalización espacial de receptores de membrana y reservorios de Ca^{2+} intracelulares

Finalmente, los datos observados también podrían ser explicados si la formación de mensajero subsecuente a activación del receptor muscarínico alcanzara, restrictiva o preferentemente, almacenes de Ca^{2+} localizados en la proximidad de la membrana plasmática (figura 79C). En cambio, el mensajero producido tras estimulación α_1 -adrenérgica tendría una distribución más amplia, que alcanzaría los almacenes submembrana y otros localizados más centralmente.

La hipótesis de la colocalización de receptores muscarínicos con reservorios de Ca^{2+} submembrana, implica que el mensajero que se sintetiza en las proximidades del receptor tenga un efecto y una degradación restringidos espacialmente sobre un almacén localizado adyacentemente. Para contrastar esta hipótesis pueden ser necesarios medidas del Ca^{2+} citosólico de suficiente resolución temporal y espacial.

La existencia de dos almacenes de Ca^{2+} funcionalmente distintos en células pineales puede estar determinada, como hemos visto, por la naturaleza o la localización y agregación

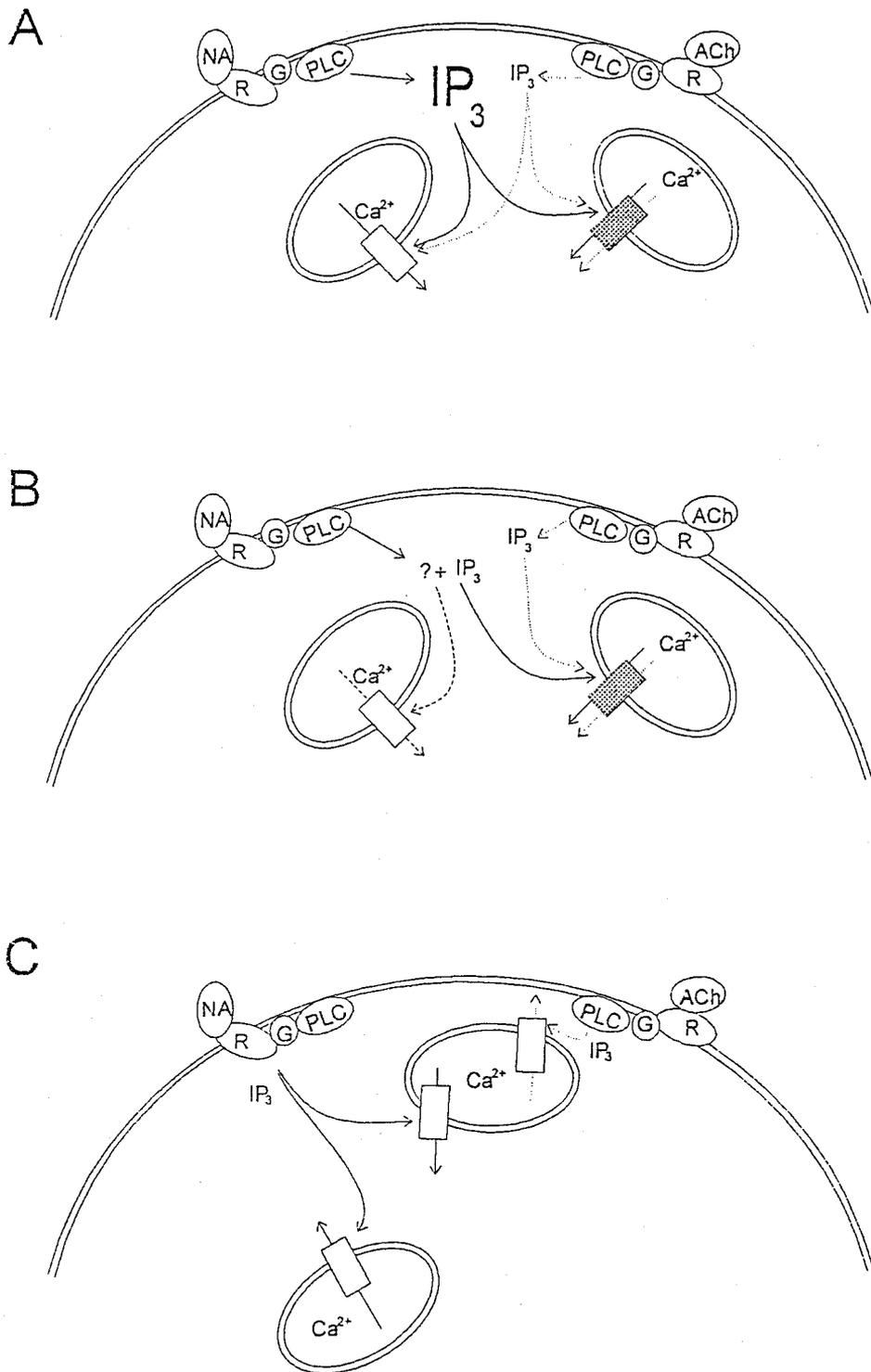


Figura 78. Hipótesis de liberación selectiva de Ca^{2+} de almacenes intracelulares inducida por agonista. **A.** Liberación cuantitativa de Ca^{2+} de almacenes intracelulares. **B.** Coexistencia de distintos tipos de canales de liberación de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares. **C.** Colocación espacial de receptores de membrana y almacenes de Ca^{2+} intracelulares.

Discusión

de los canales de liberación de Ca^{2+} y podría ser un método para determinar que la señal de Ca^{2+} inducida por distintos agonistas ejerza acciones específicas. Así, el significado funcional de la liberación de Ca^{2+} selectiva sería transmitir intracelularmente una señal conservando la especificidad de acción propia del neurotransmisor (NA o ACh) que la indujo.

6.2 BASES IÓNICAS DE LOS CAMBIOS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA INDUCIDOS POR AGONISTA

Trabajos previos en células pineales han puesto de manifiesto que NA hiperpolariza el potencial de membrana celular (Sakai y Marks, 1972; Parfitt y col., 1975; Freschi y Parfitt, 1986) y que este efecto posiblemente esté mediado por las activación de un canal de K^+ activado por Ca^{2+} descrito en estas células (Ceña y col., 1991).

En el presente trabajo se han estudiado los cambios de permeabilidad de membrana inducidas por NA y ACh puesto que aunque se habían descrito las conductancias dependientes de voltaje presentes en pinealocitos de mamíferos (Aguayo y Weigth, 1988; Castellano, López-Barneo y Armstrong, 1989), no se conocían las bases iónicas de las modificaciones del potencial de membrana celular inducidas por agonistas en estas células.

6.2.1. Fenómenos eléctricos de membrana

Mediante la técnica de registro extracelular se ha demostrado incremento de la actividad eléctrica de la glándula pineal paralelo al incremento de la secreción hormonal (Reuss y Vollrath, 1984). Otros trabajos previos, usando microelectrodos de registro extra e intracelular han mostrado la generación de espigas de potenciales de acción en algunas

células de la glándula pineal (Ronnekleiv y cols., 1980; Demaine y cols., 1984; Parkington y cols., 1987). No obstante, no se sabe si la actividad eléctrica registrada reside en los pinealocitos o en los axones de las neuronas que los inervan.

6.2.2. Corrientes activadas por voltaje

En registros de "patch-clamp" de pinealocitos de rata, no se han encontrado corrientes de Na^+ aunque sí una pequeña conductancia despolarizante de Ca^{2+} (Aguayo y Weigh, 1988). En pinealocitos de pollo se ha mostrado que los canales de Ca^{2+} activados por voltaje están implicados en la regulación de la síntesis de melatonina (Harrison y Zatz, 1989).

Los pinealocitos de mamíferos poseen varios tipos de corrientes de K^+ que han sido caracterizados como del tipo A y rectificador tardío, I_A e I_{DR} ("delayed rectifier"), respectivamente (Aguayo y Weigh, 1988; Castellano, López-Barneo y Armstrong, 1989). Así mismo, estas células poseen canales de K^+ activados por Ca^{2+} , $K_{(Ca)}$ (Halperin y Yeandle, 1987; Ceña y cols, 1991) que también presentan voltaje dependencia.

6.2.3. Corrientes iónicas activadas por Ca^{2+}

En este trabajo se ha estudiado el efecto de dos neurotransmisores, NA y ACh, sobre la permeabilidad de membrana de células pineales. Como se ha mostrado previamente, los agonistas α_1 -adenérgicos y muscarínicos inducen un incremento transitorio del Ca^{2+} intracelular, debido a la liberación de almacenes intracelulares y a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Así mismo, hemos mostrado que NA y ACh a través de la activación de receptores α_1 -adenérgicos y muscarínicos, respectivamente, activan dos conductancias dependientes de Ca^{2+} , $g_{Cl(Ca)}$ y $g_{K(Ca)}$.

Discusión

La amplitud media de la corriente de Cl⁻ inducida con ACh fue significativamente mayor de la activada con NA. Este resultado está en concordancia con la mayor amplitud de la señal de Ca²⁺ obtenida con ACh, comparada con la inducida por NA.

La corriente de Cl⁻ activada por incrementos transitorios de Ca²⁺ ha sido registrada entre otras en células de la glándula lagrimal de rata (Marty y col., 1986; Marty y Tan, 1989), donde se le supone un papel en la secreción exocrina de Cl⁻ por la glándula, y en células cebadas (Mathews, Neher, y Penner, 1989) cuyo significado funcional puede ser el incremento del gradiente electroquímico del Ca²⁺ para aumentar su entrada en la célula desde el medio extracelular. Sin embargo, esta corriente difiere de la corriente lenta de Cl⁻ activada por nucleótidos (AMPc o GTPγS) registrada también en células cebadas (Mathews, Neher y Penner, 1989).

6.2.3.1. Transitoriedad de las corrientes iónicas activadas por Ca²⁺

Las corrientes de K⁺ y Cl⁻ activadas por agonista fueron transitorias al igual que los incrementos de la [Ca²⁺] citosólico. No obstante, sorprende que la duración de las corrientes transitorias activadas por Ca²⁺ fuera menor que la de los incrementos de Ca²⁺ inducidos por agonista. La rápida desactivación de las corrientes activadas por Ca²⁺ pudo ser debida a una o varias de las siguientes posibilidades: 1) que los canales sólo sean activados por encima de una cierta concentración de Ca²⁺ citosólico, 2) que la diálisis del medio intracelular inactiva o diluya algún componente intracelular requerido para mantener los canales activados, 3) que la desactivación de los canales sea dependiente de tiempo.

En relación con la primera posibilidad, el abrupto inicio de la señal de Ca²⁺ y de las corrientes activadas por Ca²⁺ sugieren la existencia de un umbral en el proceso de activación de la respuesta de Ca²⁺ (Parker e Ivorra, 1990). No obstante, las duraciones de las

corrientes activadas por Ca^{2+} fueron, independientemente de la duración de la aplicación del agonista, muy similares entre si, a diferencia de la duración de las señales de Ca^{2+} . Esto sugiere que la desactivación de la corriente puede ser independiente del nivel de Ca^{2+} citosólico. Esta independencia también viene apoyada por la observación de que las señales de Ca^{2+} con cursos temporales muy diferentes, como las inducidas por ACh y NA, originen corrientes activadas por Ca^{2+} con cursos temporales muy similares.

Respecto a la segunda posibilidad, la inclusión en la pipeta de ATP, GTP y/o GTPγS en nuestros experimentos no previno ni enlenteció la relajación de la corriente. Por otro lado, en experimentos hechos con nistatina, para prevenir el aclaramiento y dilución de componentes intracelulares no iónicos, no pareció evidenciarse ninguna diferencia en el curso temporal de la desactivación de la corriente.

La obtención de registros simultáneos de incrementos transitorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de las corrientes iónicas transitoria, ambos inducidos por agonista, proporcionaría información valiosa sobre el curso temporal de la relajación de la $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ o $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ en relación al de la señal de Ca^{2+} .

6.2.3.2. Corrientes activadas por un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}

Los transitorios de corrientes activadas por Ca^{2+} también fueron inducidas por la exposición del interior celular a una solución de alto Ca^{2+} , la de la pipeta de registro (p.e., 900 nM). El tiempo requerido para que la concentración de Ca^{2+} en la pipeta alcanzase el equilibrio con la concentración en el citosol ha sido estimado, sin tener en consideración los tampones de Ca^{2+} intracelulares, en aproximadamente 100 s (Fenwick y col., 1982; Push y Neher, 1988). Sin embargo, la activación de los transitorios dependientes de Ca^{2+} ocurrieron

Discusión

de modo más rápido.

Por otro lado, la activación de las corrientes fue súbita, con un curso temporal sigmoide. Este comportamiento no es propio de un modelo de difusión simple de Ca^{2+} . Al contrario, la hipótesis de difusión-tamponamiento de Ca^{2+} predice que la activación de las corrientes inducidas por Ca^{2+} debería ser gradualmente mayor conforme se fuera alcanzando el equilibrio.

Tampoco es compatible con un modelo de difusión simple, el que la diálisis celular con soluciones de Ca^{2+} intermedio (100-260 nM) indujesen corrientes activadas por Ca^{2+} de amplitud similar a las obtenidas con soluciones de alto Ca^{2+} (900 nM). En efecto, la única diferencia entre ambas situaciones fue que con soluciones de Ca^{2+} intermedio el porcentaje de éxitos en inducir las corrientes activadas por Ca^{2+} fue menor.

Estas observaciones sugieren más bien un modelo cooperativo o de retroalimentación positiva donde la diálisis de Ca^{2+} constituye sólo el gatillo que desencadena el proceso de activación las conductancias dependientes de Ca^{2+} , probablemente, por un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR)

6.2.4. Papel funcional de la activación de $g_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ y $g_{\text{K}(\text{Ca})}$

En la mayoría de las células excitables, la activación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje lleva a un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico que desencadena un proceso excitotóxico. En células secretoras no excitables, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de canales de Ca^{2+} independientes de voltaje regula la síntesis y secreción de hormonas y fluidos (Takahashi, Neher, y Sakmann, 1987; Marty, Tan, y Trautmann, 1984; Petersen y Maruyama, 1984; Finlay y Petersen, 1985; Marty y col., 1986).

En los últimos años, se ha obtenido información acerca de las vías de entrada de Ca^{2+} independientes de voltaje. Las vías para la entrada de Ca^{2+} parecen ser diversas y algunas son selectivas para el Ca^{2+} ($I_{(\text{CRAC})}$), pero otras no. El conocimiento sobre cómo la entrada de Ca^{2+} es regulada a través de éstas vías es todavía muy escaso, sin embargo, para incrementar la cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula existen dos posibilidades: 1) modificar el número de canales y/o la probabilidad de estar abiertos y 2) incrementar el gradiente electroquímico para el Ca^{2+} .

Respecto a la primera posibilidad, recientemente, se ha mostrado que $I_{(\text{CRAC})}$ puede ser regulada por una proteína quinasa (Parekh y Penner, 1995). Respecto a la segunda, la activación de conductancias K^+ y/o Cl^- dependientes de Ca^{2+} conducen a una hiperpolarización del potencial de membrana, en algunas células (Penner, Matthews y Neher, 1988; Matthews, Neher y Penner, 1989), incrementando de éste modo el gradiente electroquímico para el Ca^{2+} . Probablemente, ambos mecanismos podrían operar en la misma célula al mismo tiempo.

En el presente trabajo, se ha mostrado que NA, también ACh, activan una $g_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ y una $g_{\text{K}(\text{Ca})}$ y se propone que, como en otras células, estas conductancias iónicas estarían implicadas en inducir cambios en el potencial de membrana celular que modularían la cantidad de Ca^{2+} que entra al citosol desde el medio externo.

6.2.5. Modificaciones del potencial de membrana inducidas por $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ e $I_{\text{K}(\text{Ca})}$

Hemos visto que las conductancias activadas por Ca^{2+} tienen un curso temporal generalmente simétrico en condiciones de fijación de voltaje. Sin embargo, esto no debe ser así en ausencia de fijación de voltaje. La linealidad de la curva corriente-voltaje de la conductancia $g_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ sugiere que ésta no es dependiente de voltaje. Sin embargo, la

Discusión

conductancia $g_{K(Ca)}$, como pone de manifiesto la rectificación de su curva corriente-voltaje con un umbral de activación en torno a los -35 mV, sí es dependiente de voltaje.

Por otro lado, es evidente que la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} es una conductancia hiperpolarizante ya que el potencial de equilibrio para el K^+ (E_K) en condiciones fisiológicas es muy negativo. Sin embargo, la corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} , dependiendo del valor del potencial de equilibrio para el Cl^- (E_{Cl}) en relación al potencial de membrana en reposo de la célula, puede operar como una conductancia despolarizante o hiperpolarizante. No obstante, si el E_{Cl} de las células pineales es similar al de otras células (p.e., -34 mV en células hepáticas, Claret y Mazet, 1972), dado que el potencial de membrana de los pinealocitos puede ser más negativo de lo registrado con soluciones simétricas de Cl^- , la activación de $I_{Cl(Ca)}$ tendría un efecto despolarizante o, al menos, estabilizante de membrana en torno al potencial de membrana en reposo.

Así pues, el efecto que sobre el potencial de membrana tuviera la aplicación de NA o ACh, dependería del balance entre la activación de la conductancias despolarizantes e hiperpolarizantes.

La medición de los cambios de voltaje, monitorizados a través del cambio de amplitud de un sólo canal, en célula intacta (no dializada) pone de manifiesto que la aplicación de un agonista, p.e. ACh, puede inducir alternativamente despolarización e hiperpolarización, si bien el efecto hiperpolarizante suele ser de mayor duración.

Por otro lado, el papel funcional de una corriente hiperpolarizante inducida por agonista sería, como ha sido descrito en otras células, incrementar el gradiente electroquímico para el Ca^{2+} . Esta estrategia puede ser de importancia para incrementos de Ca^{2+} citosólico tónicos y mantenidos como los que tienen lugar a través de un mecanismo capacitativo.

6.3. SECRECIÓN DE INDOLAMINAS

Debido a su alto coeficiente de lipofiliidad y, por tanto, su facilidad para atravesar membranas biológicas, se ha asumido durante mucho tiempo que la melatonina no se almacena, ni secreta por exocitosis sino que sale de la célula por difusión simple conforme se sintetiza (Wurtman, 1980). Sin embargo, actualmente, hay un consenso general en que la melatonina es liberada de forma pulsátil por los pinealocitos (Reiter y cols, 1987; English y cols., 1987; Cozzi y cols, 1988, ver figura 8 A), siendo especialmente evidente cuando sus niveles son medidos a nivel del drenaje venoso de la glándula pineal, seno confluente. Así mismo, la estimulación eléctrica del ganglio cervical superior no sólo incrementa la secreción basal de melatonina sino que adicionalmente produce una liberación pulsátil (Chang, Cheung y Pan, 1989, ver figura 8 B). Estudios *in vitro* de glándulas pineales de rata perfundidas también indican que la liberación de melatonina es pulsátil cuando las glándulas se exponen a NA (Simonneux y cols., 1989).

La liberación episódica de melatonina sugiere que la liberación está regulada, a través de un sistema de almacenamiento o retención de corta duración o/y la liberación se produce de forma activa.

Por otro lado, el mecanismo de secreción de otras sustancias sintetizadas por el pinealocito (otros indoles y los péptidos) es hasta el momento totalmente desconocido.

A continuación se discuten los resultados obtenidos con las dos técnicas utilizadas para monitorizar la secreción en nuestros experimentos.

6.3.1. Productos de secreción en poblaciones celulares

La detección electroquímica de sustancias presentes en medio de cultivo de pinealocitos sembrados por varias horas ha puesto de manifiesto la presencia en el mismo de, al menos, dos sustancias con potenciales de oxidación distintos. Una con un potencial de oxidación en torno a los 800 mV, similar al característico de melatonina y triptófano, y otra, con un potencial de oxidación próximo a 440 mV, el mismo que el de la serotonina.

Por tanto, el empleo de la técnica voltamétrica en la detección de sustancias electroquímicas en medio de cultivo de pinealocitos de varias horas de evolución, sugiere que los productos de secreción indólicos de las células pineales pueden ser serotonina y melatonina, o metabolitos químicamente muy relacionados con potenciales de oxidación próximos al de serotonina y melatonina, respectivamente.

6.3.2. Productos de secreción en célula única

En células dializadas no se pudo registrar nunca transientes amperométricos en respuesta a estímulos externos (agonistas) o a cambios del potencial de membrana, aún cuando se probó un rango muy amplio de $[Ca^{2+}]_i$, así como, la inclusión de nucleótidos en la solución intracelular (ATP, AMPc, GTP y GTPγS).

En células no dializadas, la aplicación de un estímulo externo (ACh) dio lugar en algunas células a una corriente amperométrica en forma de espiga única. Algunos transientes fueron precedidos por una corriente más pequeña y lenta que podría representar la liberación a través de un poro de fusión acacheteadas parcialmente abierto, como ha sido descrito en otros tipos celulares (Alvarez de Toledo, Fernández-Chacón y Fernández, 1993; Chow, von Rüden, Neher, 1992;) y que se ha denominado *foot*.

Llama la atención que los transitorios de liberación detectados fueron únicos y de

gran amplitud. Esta observación tiene un posible correlato en las medidas de capacidad celular cuando se registraron saltos discretos de gran tamaño. Ello podría sugerir una fusión intracelular de múltiples vesículas formando una vesícula de mayor tamaño que, a su vez, se fundiría con la membrana plasmática a través de un único poro acacheteadas, como ha sido demostrado en eosinófilos (Scepek y Lindau, 1993).

Aunque de las características de la señal amperométrica de liberación no se identificó qué metabolito de la vía de síntesis de melatonina fue el responsable de la misma, el potencial de oxidación de la(s) sustancia(s) detectada(s), ≤ 600 mV, es compatible con que la sustancia detectada fuera serotonina (potencial de oxidación 440 mV) pero no melatonina (potencial de oxidación 800 mV).

6.3.3. Medidas de capacidad eléctrica

Estudios ultraestructurales en los pinealocitos han mostrado la presencia de vesículas de pequeño tamaño de grano denso (Pevet, 1981) sin que hasta ahora se disponga de información acerca del significado funcional de las mismas. Sin embargo, existen datos en la literatura que indican que en estas células algunas de las sustancias sintetizadas podrían liberarse por un mecanismo de exocitosis. Se ha descrito que pueden secretar serotina y, posiblemente, algunos péptidos. No obstante, no existen pruebas directas de este tipo de secreción.

Con el objetivo de estudiar esta posibilidad, en el presente trabajo se ha utilizado el registro de la capacidad eléctrica como medida de los cambios de superficie de la membrana celular. Los experimentos realizados muestran que en estas células se produce un incremento de la superficie celular de hasta un 36%. Estos incrementos se observaron sólo en células dializadas con alto $\text{Ca}^{2+} \geq 1\mu\text{M}$. Sin embargo, un estudio más detallado de

Discusión

la regulación éste proceso se hace necesario.

Por otro lado, en algunas células también se detectaron cambios de capacidad discretos de gran amplitud (> 100 fF). El tamaño medio de las vesículas al microscopio electrónico es de 100 nm de diámetro. Si se asume una constante dieléctrica de la membrana celular de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$, la fusión simultánea de unas 300 vesículas daría lugar a un incremento de capacidad súbito como el observado. Otra posibilidad, quizás más plausible, fuera la fusión intracelular de numerosas vesículas previa a la fusión de una de ellas con la membrana plasmática, como se ha mostrado en eosinófilos (Scepek y Lindau, 1993).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han puesto a punto distintas técnicas para estudiar los mecanismos implicados en las diferentes etapas del proceso de acoplamiento estímulo-secreción en pinealocitos. Por un lado, se ha utilizado microfluorometría para monitorizar cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ ante estímulos adrenérgicos y colinérgicos. Por otro lado, se ha usado la técnica de "patch clamp" en sus distintas configuraciones para estudiar el efecto de los estímulos adrenérgicos y colinérgicos sobre las conductancias de la membrana y el potencial de membrana. Por último, se han empleado en el estudio de la secreción: la amperometría/voltametría para la detección electroquímica de sustancias secretadas por la célula y el registro de la capacidad eléctrica como medida de los cambios en la superficie de la membrana plasmática.

2. Noradrenalina (NA) produce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ bifásico consistente en una o varias espigas seguidas de una meseta resultantes de la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y de la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo, respectivamente. Esta respuesta fue reproducida por el agonista α_1 -adrenérgico, fenilefrina (PE), en presencia del antagonista β -adrenérgico, propanolol, y es abolida cuando NA o PE fueron aplicados con el antagonista α_1 -adrenérgico, prazosín. La curva que relaciona la amplitud de la señal de Ca^{2+} con la [PE] (0.5-10 μ M) mostró que la [PE] a la que se alcanzaba el 50% de la amplitud máxima es 0.6 μ M, y que la saturación de la respuesta ocurre a [PE] mayores de 2 μ M.

3. Acetilcolina (ACh) también produce un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ consistente en una subida súbita hasta un nivel máximo desde el que decae exponencialmente hasta

Conclusiones

los niveles basales de Ca^{2+} . La curva dosis respuesta muestra un 50% de la amplitud máxima a una $[\text{ACh}]$ de $59 \mu\text{M}$. El agonista muscarínico Carbacol (CCh), activa incrementos de Ca^{2+} citosólico mientras que el antagonista muscarínico, atropina, los previene.

4. En 0 Ca^{2+} , estímulos repetidos con agonistas α_1 -adrenérgicos y muscarínicos provocan una progresiva disminución de la amplitud de las señales de Ca^{2+} debida a vaciamiento de los almacenes intracelulares. Sin embargo, la extinción de la respuesta a los agonistas muscarínicos no suprime la respuesta a los agonistas α_1 -adrenérgicos, mientras que la extinción de la respuesta adrenérgica si anula la muscarínica.

5. Ni la señal de Ca^{2+} mediada por agonistas α_1 -adrenérgicos ni la mediada por muscarínicos se afecta por la incubación previa de las células con toxina *pertussis* (PTX). Así mismo, cafeína no provocó señales de Ca^{2+} ni previene las producidas por agonistas α_1 -adrenérgicos o muscarínicos.

6. Estos resultados de microfluorometría sugieren que los agonistas α_1 -adrenérgicos y muscarínicos liberan Ca^{2+} selectivamente de almacenes intracelulares, insensibles a cafeína, funcionalmente distintos.

7. En fijación de voltaje, ambos neurotransmisores (NA y ACh) activan dos corrientes iónicas transitorias: una de potasio (I_K) y otra de cloruro (I_{Cl}).

8. La activación de ambas conductancias por NA es independiente de la presencia de propanolol en la solución externa y puede ser reproducida con PE. Sin embargo, ni I_K ni I_{Cl} se activan por agonistas α_1 -adrenérgicos en presencia de prazosín.

9. La diálisis de las células con soluciones de alto Ca^{2+} activan igualmente las I_{Cl} e I_{K} transitorias sin la aplicación de agonistas externos, mientras que no se activaron con soluciones carentes de Ca^{2+} .

10. El potencial de membrana de reposo es de $32.1 \pm 8.1 \text{ mV}$, medido en situación de fijación de corriente mediante la técnica de "patch-clamp", área de membrana perforada con nistatina. La aplicación de ACh produce preferentemente cambios despolarizantes del potencial de membrana monitorizado en fijación de corriente de células parcialmente dializadas (área de membrana perforada con nistatina) con soluciones simétricas de Cl^- , siendo el potencial de reversión de estos cambios de voltaje entre -25 y -5 mV .

11. En algunas células sometidas a fijación de corriente, así como, en células no dializadas en las que se monitorizaron los cambios del potencial de membrana mediante el registro de la amplitud de corriente iónica a través de un canal único *in situ*, se observan cambios bifásicos del potencial de membrana (despolarización e hiperpolarización).

12. El medio de cultivo tras varias horas de la siembra de pinealocitos contiene varias sustancias oxidables. Los potenciales de oxidación de las sustancias detectadas son compatibles con la presencia en el medio de serotonina y melatonina o, al menos, otras sustancias electroquímicamente muy relacionadas.

13. Algunos incrementos transitorios de corriente amperométrica están precedidos de una corriente lenta que puede representar la liberación de parte del contenido de una vesícula a través de un poro de fusión excitotóxico, parcialmente abierto.

Conclusiones

14. Los resultados obtenidos con las medidas de capacidad eléctrica y de amperometría sugieren que uno o varios de los productos sintetizados en la pineal son almacenados intracelularmente en vesículas y secretados por exocitosis.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

AGUAYO, L.G. y WEIGHT, F. (1988). Characterization of membrane currents in dissociated adult rat pineal cells. *Journal of Physiology* **405**, 397-419.

ALMERS, W. y McCLESKEY, (1984). Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *Journal of Physiology* **353**, 585-608.

ALMERS, W. y NEHER, E. (1985). The Ca²⁺ signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the method of dye-loading. *FEBS Letters* **192**, 13-18.

ALVAREZ DE TOLEDO, G., FERNANDEZ-CHACON , R. y FERNANDEZ, J.M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*. **363**: 554-558.

AUERBACH, D.A., KLEIN, D.C., WOODARD, C. y AUERBACH, G.D. (1981). Neonatal rat pinealocytes: typical and atypical characteristics of [¹²⁵I]iodohydroxybenzylpindolol binding and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation. *Endocrinology* **108**, 559-567.

BARLOW-WALDEN, L.R., REITER, R.J., ABE, M., PABLOS, M.I., MENENDEZ-PELAEZ, A., CHEN, L.D. y POEGGELER, B. (1995) Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.*, (en prensa).

Bibliografía

BERRIDGE, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. **361**: 315-325.

BLASK, D.E. (1984). The pineal: an oncostatic gland? En *The Pineal Gland*, pp 253-284. R.J. Reiter (ed), Raven Press, Nueva York.

BASINSKA, J., SASTRY, P.S. y STANCER, H.C. (1973). Incorporation of ³²Pi orthophosphate into phospholipids of calf pineal slices in the presence and absence of neurotransmitter. *Endocrinology* **92**, 1588-1595.

BINKLEY, S. (1986). Melatonin and N-acetyltransferase rhythms in pineal and retina. En *Pineal-Retinal Relationships*. Klein D.C. y O'Brien P.J. (ed). Academic Press, Nueva York.

BOSIN, T.R. (1978). Serotonin metabolism, En *Serotonin in Health and Disease*, Vol.1, W.B. Essman (ed.), SP Medical and Scientific Books, Nueva York.

BUIJS, R.M. y PEVET, P. (1980). Vasopressin- and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. *Cell Tissue Research*, **205**: 11-17.

CASSONE, V.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends in Neuroscience* **13 (11)**: 457-64.

CARDINALI, D.P. (1981). Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocrine Rev.* **2 (3)**: 327-346

CARDINALI, D.P., VACAS, M.I., ROSENSTEIN, R.E. y col. (1987). Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: an analysis through binding sites. En *Advances in Pineal Research*. Reiter, R.J., Fraschini R. (ed). Vol 2. Londres, John Libbey, pp 51.

CARLSON, L.L., WEAVER, D.R. y REPERT, S.M. (1989). Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology*. **125 (5)**: 2670-6.

CASTELLANO, A., LÓPEZ-BARNEO, J. y ARMSTRONG, C. M. (1989). Potassium current in dissociated cells of the rat pineal gland. *Pflügers Archiv* **413**, 644-650.

CEÑA, V., HALPERIN, J. I., YEANDALE, S. y KLEIN, D.C. (1991). Norepinephrine stimulates potassium efflux from pinealocytes: evidence for involvement of biochemical "AND" gate operated by calcium and adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology* **128**, 559-569.

CLARET, M. y MAZET, J.L. (1972). Ionic fluxes and permeabilities of cell membranes in rat liver. *Journal of Physiology* **223**: 279-295.

CLEMENTI, E., SCHEER, H., ZACCHETTI, D., FASOLATO, C., POZZAN, T. y MELDOLESI, J. (1992). Receptor-activated Ca^{2+} influx. Two independently regulated mechanisms of influx stimulation coexist in neurosecretory PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **267 (4)**: 2164-72.

Bibliografía

COLLIN, J.P., MIRSHAHI, M., BRISSON, P., FALCON, J., GUERLOTTE, J. Y FAURE., J.P. (1986). Pineal-retinal molecular relationships: distribution of "S antigen" in the pineal complex. *Neuroscience*, **19** (2): 657-668.

COZZI, B., RAVAUULT, J.P., FERRANDI, B. y REITER, R.J. (1988). Melatonin concentration in the cerebral vascular sinuses of sheep and evidence for its episodic release. *Journal of Pineal Research* **5**: 535-543.

CHAN, A. y EBADI, M. (1980). The kinetics of norepinephrine-induced stimulation of serotonin *N*-acetyltransferase in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology*, **31**: 244-251.

CHAN, Y.S., CHEUNG, Y.M. y PANG, S.F. (1989). Pulsatile release of pineal melatonin in the rabbit. En: *Advances in Pineal Research*. R.J.Reiter y S.F. Pang, (eds), pp:185-188. John Libbey, Londres.

CHEEK, T.R., BERRIGDE, M.J., MORETON, R.B., STAUDERMAN, K.A., MURAWSKY, M.M. y BOOTMAN, M.D. (1994). Quantal Ca^{2+} mobilization by ryanodine receptors is due to all-or-none release from functionally discrete intracellular stores. *Biochemical Journal* **301**, 879-893.

CHEEK, T.R., MORETON, R.B., BERRIGDE, M.J., STAUDERMAN, K.A., MURAWSKY, M.M. y BOOTMAN, M.D. (1993). Quantal Ca^{2+} release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 27076-27083.

CHOW, R. H., VON RÜDEN L. y NEHER E.(1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* **356**: 60- 63.

DAFNY, N. (1977). Electrophysiological evidence of photic, acoustic, and central input to the pineal body and hypothalamus. *Experimental Neurology* **55**: 449-457.

DAFNY, N. (1980). Two photic pathways contribute to pineal evoked responses. *Life Sciences* **26**: 737-742.

DEGUCHI, T. (1981). Rhodopsin-like photosensitivity of isolated chicken pineal gland. *Nature*, **290**: 706-709.

DEMAINE, C., SAMILOFF, J.D. Y STOUGHTON, R. (1984). Spontaneous electrical activity and response to testosterone of cell of the pineal gland of the Syrian hamster. *Journal of Physiology* **346**: 130P.

DOREY C. y FAURE J.P. (1977). Isolement et caracterisation partielle d'un antigène rétinien responsable de l'uvéa-rétinite autoimmune expérimentale. *Annls Immunol, Inst. Pasteur.* **128C**, 229-232.

DRYER, S.E. y HENDERSON. D.(1991). A cyclic GMP-activated channel in dissociated cells of the chick pineal gland. *Nature* **353**, 756-758.

Bibliografía

DUBOCOVICH, M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*. **306**, 782-784.

EBADI, M. (1984). Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology. En *The Pineal Gland*, R.J. Reiter (ed.), pp 1-37, Raven Press, Nueva York, 1.

EBADI, M. y GOVITRAPONG, P., (1987). High-affinity [³H] substance P binding site and its function in the pineal organ, in *Advances in Pineal Research*, Vol 2, R.J. Reiter y F. Fraschini (eds.), John Libbey, Londres, 81.

ENGLISH, J., ARENDT J., POULTON A. y SYMONS, A.M. (1987). Short-term variations of circulating melatonin in the ewe. *Journal of Pineal Research* **4**: 359-366.

FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology* **245**: 1-14.

FASOLATO, C., ZOTTINI, M., CLEMENTI, E., ZACCHETTI, D., MELDOLESI, J. y POZZAN, T. (1991). Intracellular Ca²⁺ pools in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 20159-20167.

FENWICK, E.M., MARTY, A. y NEHER, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* **331**: 599-635.

FERRIS, C.D., CAMERON, A.M., HUGANIR, R.L. y SNYDER, H. (1992). Quantal calcium release by purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Nature* **356**, 350-352.

FERRIS, C.D. y SNYDER, S.H. (1992). Inositol, 1-4-5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annual Review of Physiology* **54**: 469-488.

FIDLER, N. y FERNANDEZ, J. M., (1989). Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurements. *Biophysical Journal* **56**: 1153-1162.

FINDLAY, I. y PETERSEN, O.H. (1985). Acetylcholine stimulates a Ca^{2+} -dependent Cl⁻ conductance in mouse lacrimal acinar cells. *Pflügers Archiv* **403**, 328-330.

FINOCCHIARO, L.M.E, GOLDSTEIN, D.J., FINKIELMAN, S. y NAHMOD, V.E. (1990). Interaction of angiotensin II with the cholinergic and noradrenergic systems in the rat pineal gland: regulation of indole metabolism. *Journal of Endocrinology* **126**: 59-66.

FINOCCHIARO, L.M.E., SCHEUCHER, A., FINKIELMAN, S., NAHMOD, V.E. y PIROLA, C.J. (1989). Muscarinic effects on the hydroxy- and methoxyindole pathway in the rat pineal gland. *Journal of Endocrinology* **123**: 205-211.

Bibliografía

FINOCCHIARO, L.M.E. y TELLEZ-IÑON, M.T. (1991). Effects of cholinergic muscarinic agents on protein kinase C activity in rat pineal gland. *Cell Biology International Reports* **15**, 943-954.

FRESCHI, J.E. y PARFITT, J.E. (1986). Intracellular recording from pineal cells in tissue culture: membrane properties and responses to norepinephrine. *Brain Research* **368**, 366-370.

GARDINALI D.P., VACAS M.I., ROSENSTEIN, R.E. et al. (1987). Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: an analysis through binding sites. En: *Advances in Pineal Research*. R.J. Reiter y F. Fraschini (ed) , vol 2. , John Libbey, Londres.

GIANNINI, G., CLEMENTI, E., CECI, R., MARCIALI, G. y SORRENTINO, V. (1992). Expression of a ryanodine-Ca²⁺ channel that is regulated by TGF- β . *Science* **257**: 91-94.

GOLDBERG, G., SHAPIRA, H. y ORON Y. (1992). Inositol trisphosphate may access calcium from stores not coupled to muscarinic receptors in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv* **420**, 313-318.

GOVITRAPONG, P. y EBADI, M. (1988). The inhibition of pineal arylalkylamine *N*-acetyltransferase by glutamic acid and its analogues. *Neurochem. Int.*, **13**: 223.

GOVITRAPONG, P., HAMA Y., PFEIFFER, R. y EBADI, M. (1989). Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D₂-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture. *Journal of Pineal Research* **6**: 17-31.

GOVITRAPONG, P., PARIYANONTH, M. y EBADI, M. (1992). The presence and actions of opioid receptors in bovine pineal gland. *Journal of Pineal Research* **13**: 124-132.

GRYNKIEWICZ, C., POENIE, M. y TSIEN, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450.

HALPERIN, J.I. y YEANDLE, S. (1987). Large conductance channel in rat pineal cells. *Biophysical Journal*. **51**. 248a.

HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. y SIGHWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85-100.

HAMM, H.E. y MENAKER, M. (1981). Pineal and retinal serotonin N-acetyltransferase activity: Modulation by phosphate. *J. Neurochem*, **37**: 1567-1572.

HARDIE, R.C. y MINKE, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. **8** (4): 643-51.

Bibliografía

HARRISON, N.L. y ZATZ, M. (1989). Voltage-dependent calcium channels regulate melatonin output from cultured chick pineal cells. *The Journal of Neuroscience* **9**: 2462-2467.

HAUSER, G., KIRK, K. L. y PARKS, J. M. (1983). Differential effects of fluoronorepinefrines on phosphatidylinositol turnover in rat pinealocytes. *The Journal of Neurochemistry* **41**, 1196-1199.

HESS, P. y TSIEN, R.W. (1984). Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* **309**, 453-456.

HO, A.K., CHIK, C.L. y KLEIN, D.C. (1987). Protein kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 10059-10064.

HO, A.K., THOMAS, T.P, CHIK, C.L., ANDERSON, W.B. y KLEIN, D.C. (1988). Protein kinase C: subcellular redistribution by increased Ca^{2+} influx. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 9292-9297.

HORN, R. y MARTY, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *Journal of General Physiology* **92**: 145-159.

HOTH, M. y PENNER, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. **355 (6358)**: 353-356.

IRVING, A.J., COLLINGRIDGE, G.L. y SCHOFIELD, J.G. (1992). L-glutamate and acetylcholine mobilise Ca^{2+} from the same intracellular pool in cerebellar granule cells using transduction mechanisms with different Ca^{2+} sensitivities. *Cell Calcium* **13**: 293-301.

JI, H., SANDBERG, K., BONNER, T.I. y CATT. K.J. (1993). Differential activation of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pools by muscarinic receptors in *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Calcium* **14**, 649-662.

JOSHI, C. y FERNANDEZ, J.M.(1988). Capacitance measurements: an analysis of the phase detector technique used to study exocytosis and endocytosis. *Biophysical Journal*. **53**: 885-892.

KALSOW C.M. y WACKER W.B. (1977). Pineal reactivity of anti-retina sera. *Investivative Ophthalmology & Visual Science* **16**: 181-184

KENNY, G.C.T. (1961): The "nervus conarii" of the monkey. (An experimental study). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **20**: 563-570.

KING, T.S. y STEINLECHNER, S., (1985). Pineal indolalkylamine synthesis and metabolism: kinetic considerations, *Pineal Research Review* **3**: 69.

Bibliografía

KLEIN, D.C., AUERBACH, D.A. y WELLER, J.L. (1981). Seesaw signal processing in pineal cells: homologous sensitization of adrenergic stimulation of cyclic GMP accompanies homologous desensitization of β -adrenergic stimulation of cyclic AMP. *Proceeding of the National Academic of Science of the USA* **78**, 4625-4629.

KLEIN, D.C., BUDA, M.J., KAPOOR, C.L. y KRISHNA, G. (1978). Pineal serotonin N-acetyl transferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turn off". *Science* **199**: 309-311.

KLEIN, D.C. y WELLER, J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **169**: 1093-1095.

KWAN, C.Y., TAKEMURA, H., OBIE, J.F., THASTRUP O., y PUTNEY J. W. (1990). Effects of MeCh, thapsigargin, and La^{3+} on plasmalemmal and intracellular Ca^{2+} transport in lacrimal acinar cells. *American Journal of Physiology* **258**: C1006-C1015.

LAITINEN, J.T., TORDA, T. y SAAVEDRA, J. M. (1989a). Cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in the rat pineal gland. *The European Journal of Pharmacology* **161**, 237-240.

LAITINEN, J.T., TORDA, T. y SAAVEDRA, J. M. (1989b). Pineal muscarinic phosphoinositide response-pertussis toxin resistant signalling with very low receptor number. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **164**, 645-652.

LERNER, A.B., TAKAHASHI J.D., LEE T.H., y MORI. W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes (Abstract). *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 2587.

McPHERSON, P.S. y CAMPBELL, K.P. (1993). Characterization of the major brain form of the ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 19785-90.

MAESTRONI y GEORGES J.M. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *Journal of Pineal Research* **14**: 1-10

MAESTRONI, G.J.M., CONTI, A. y PIERPAOLI, W. (1989). Melatonin, stress, and the immune system. *Journal of Pineal Research* **7**: 203-226.

MARTY, A. y TAN, Y.P. (1989). The initiation of calcium release following muscarinic stimulation in rat lacrimal glands. *Journal of Physiology* **419**: 665-687.

MARTY, A., EVANS, M.G., TAN, Y.P. y TRAUTMANN, A. (1986). Muscarinic response in rat lacrimal glands. *Journal of Experimental Biology* **124**, 15-32.

MARTY, A., TAN, Y.P. y TRAUTMANN, A. (1984). Three types of calcium-dependent channels in rat lacrimal cells. *Journal of Physiology* **357**, 293-325

Bibliografía

MATTHEWS, G., NEHER, E. y PENNER, R. (1989). Chloride conductance activated by external agonists and internal messenger in rat mast cells. *Journal of Physiology* **418**: 131-144.

McCORD, C.P. y ALLEN F.B.(1987). Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* **23**: 207-227.

MEISTER, A. (1992) On the antioxidant effect of ascorbic acid and glutathione. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1905-1915

MEYER, T. y STRYER, L. (1990). Transient calcium release induced by successive increments of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proceeding of the National Academic of Science of the USA* **87**, 3841-3845.

MIGNERY, G.A., SÜDHOF, T.C., TAKEI, K. y DE CAMILLI, P. (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* **342**:192-195.

MILCU, S.M., PAVEL, S. y NEACSU, C. (1963). Biological and chromatographic characterization of a polypeptide with pressor and oxytocic activities isolated from bovine pineal gland. *Endocrinology*, **72**: 563-566.

MILLAR, J., WILLIAMS G.V. (1990). Fast differential ramp voltammetry: a new voltammetric technique designed specifically for use in neuronal tissue. *J. Electroanal Chem.* **282**: 33-49.

MILLER, D.J. y SMITH, G.L. (1984). EGTA purity and the buffering of calcium ions in physiological solutions. *American Journal of Physiology* **246**, C160-166.

MISSIAEN, L , TAYLOR, C.W. y BERRIDGE, M.J. (1992). Luminal Ca^{2+} promoting spontaneous Ca^{2+} release from inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *Journal of Physiology* **455**, 623-640 .

MOLLER, M. (1978). Presence of a pineal nerve (nervus pinealis) in the human fetus: a light and electron microscopical study of the innervation of the pineal gland. *Brain Research* **154**: 1-12.

MOORE, R.Y. (1978). The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog. Reprod. Biol.*, **4**: 1-29.

MUALLEM, S., PANDOL, S.J. y BEEKER, T.G. (1989). Hormone-evoked calcium release from intracellular stores is a quantal process. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 205-212.

MULLEN, P.E., LINSELL C.R., LEONE R.M., SILMAN R.E., SMITH I., HOOPER, R.J.L., FINNIE, M. y PARRAT, J.(1981). Melatonin and 5-methoxytryptophol, the 24 hour pattern of secretion in man. *Adv. Biosci.* **29**: 337-342.

Bibliografía

NEHER, E. (1988). The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *Journal of Physiology*. **395**: 193-214.

NEHER, E. y MARTY, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceeding of the National Academic of Science of the USA* **79**: 6712-6716.

NEHER, E. y SAKMAN, B. (1983). *Single-Channel Recording*. Ed. Plenum Press. Nueva York.

OKANO, T., YOSHIZAWA, T. y FUKADA, Y. (1994). Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* **372**: 94-97

PANG, S.P., YU, H.S. y TANG, P.L. (1982). Regulation of melatonin in the retinae of guinea pigs: effect of environmental lighting. *Journal of Experimental Zoology* **222**: 11-5.

PACKER, L. (1994) Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci. Amer. (Sci. Med.)* Mar/Apr, pp. 54-63.

PAREKH, A.B. y PENNER, R. (1995). Regulation of depletion-activated Ca^{2+} current by protein kinase in RBL cells. *Biophysical Journal* **68**:53a

PARKER, I. e IVORRA, I. (1990). Localized all-or-none calcium liberation by inositol trisphosphate. *Science* 250, 977-979.

PARKER, I. e IVORRA, I. (1991). Caffeine inhibits inositol trisphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology* 433, 229-240.

PARKINGTON, H.C., McCANCE, I. y COLEMAN, H.A. (1987). Two types of cell with central innervation in pineal gland of guinea pigs. *American Journal of Physiology* 252: 369-377.

PARFITT, A.G, WELLER, J.L., KLEIN, D.C., SAKAI, K. K. y MARKS, B.H. (1975). Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Molecular Pharmacology* 11, 241-255.

PAZO, I.H. (1981). Electrophysiological study of evoked electrical activity in the pineal gland. *J. Neural Transm.*, 52: 137-148.

PENNER, R., MATTHEWS, G. y NEHER, E. (1988). Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* 334, 499-504.

PETERSEN, O.H. y MARUYAMA, Y. (1984). Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307, 693-696.

Bibliografía

PEVET, P. (1981). Ultrastructure of the mammalian pinealocyte. En: *The Pineal Gland*, pp:121-154, R.J. Reiter (ed.), CRC Press, Boca Ratón.

PEVET, P. (1983). Anatomy of the pineal gland of mammals. En: *The Pineal Gland*, pp1-75, R. Reiter (ed.), Elsevier, Nueva York.

PEVET, P., BALEMANS, M.G.M., y DE REUVER, G.F. (1981). The pineal gland of the mole (*Talpa europaea L.*).VII.Activity of hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) in the formation of 5-methoxytryptophan, 5-methoxytryptamine, 5-methoxyindole-3-acetic acid, 5-methoxytryptophol and melatonin in the eyes and the pineal gland. *J. Neural Trans.*, **51**: 271.

PHANSUWAN-PUJITO, P., GOVITRAPONG, P. y EBADI, M., (1991). Inhibitory actions of muscarinic cholinergic receptor agonists on serotonin *N*-acetyltransferase in bovine pineal explants in culture. *Neurochemical Research* **16**, 885.

PIERI, C., MARRA M., MORONI, F., RECCHIONI, R.y MARCHESELLI, F.(1994) Melatonin: A Peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences* **15**: PL271-PL276.

POZO, D., REITER, R.J. , CALVO, J.P. y GUERRERO, J.M. (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sciences* **55**: PL455-PL460.

PRECHEL, M.M., AUDHYA, T.K. y SCHLESINGER, D.H. (1983). A seasonal variation in arginine vasotocin immunoreactivity in rat pineal glands. *Endocrinology*, **112**: 1474-1478.

PUSCH, M. y NEHER, E. (1988). Rates of diffusional exchanges between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Archiv* **411**: 204-211.

PUJITO, P.P., GOVITRAPONG, P. y EBADI, M. (1991). Inhibitory actions of muscarinic cholinergic receptors agonists on serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal explants in culture. *Neurochemical Research* **16**, 885-889.

PUTNEY, J. W. Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.

PUTNEY, J.W. Jr. y BIRD, G. ST. J. (1993). The signal for capacitative calcium entry. *Cell* **75**, 199-201.

QUAY, W.B. (1963). Circadian rhythms in rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photo period, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3**: 473.

REDBURN, D.A. y MITCHELL, C.K. (1989). Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. *Vis-Neurosci.* **3(5)**: 391-403.

Bibliografía

RELKIN, R. (1983). Miscellaneous effects of the pineal. En *The Pineal Gland*. Reiter, R. (ed). Nueva York, Elsevier. pp 247-272.

REITER, R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrinology Review* 1: 109-131.

REITER, R.J., COZZI, B., RAVAUULT, J.P. y FERRANDI, B.(1987). Melatonin is released episodically from the mammalian pineal gland. pp: 215-218. En: *Fundamentals and Clinics in Pineal Research*. G.P. Trentini, C. de Gaetani y P. Pevet, (eds.) Raven Press. Nueva York.

REITER R.J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN,L., CHUANG, J., ORTIZ, G.G. y ACUÑA-CASTROVIEJO,D. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research* 18: 1-11.

REPPERT, S.M., WEAVER, D.R., RIVKEES, S.A. y STOPA, E.G. (1988). Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*. 242: 78-81.

REUSS, S. y VOLLRATH, L. (1984). Electrophysiological properties of rat pinealocytes: evidence for cyrcadian and ultradian rhythms. *Experimental Brain Research* 55: 455-461.

ROBERTSON, L.M. y TAKAHASHI, J.S. (1988). Circadian clock in cell culture: I. Oscillation of melatonin release from dissociated chick pineal cells in flow-through microcarrier culture. *Journal of Neuroscience* **8**: 12-21.

ROMIJN, H.J. (1975). Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.) III. An electron microscopic investigation of the innervation. *Cell Tiss. Res.*, **157**: 25-51.

RONNEKLEIV, O.K., KELLY, M.J. y WUTTKE, W. (1980). Single unit recordings in the rat pineal gland: evidence for habenulo-pineal neuronal connections. *Experimental Brain Research* **39**: 187- 192.

SAKAI, K.K. y MARKS, B.H. (1972). Adrenergic effects on pineal cell membrane potential. *Life Science* **11**, 285-291.

SCHAPIRO S. y SALAS, M. (1971). Effects of age, light and sympathetic innervation on electrical activity of the rat pineal gland. *Brain Research* **28**: 47-55.

SCHLUMPF M., BRUININK, A., LICHTENSTEIGER, W., CORTES, R., PALACIOS, J.M. y PAZOS, A. (1987). Beta-adrenergic binding sites in fetal rat central nervous system and pineal gland: Their relation to other receptor sites. *Developmental Pharmacology and Therapeutics* **10**, 422.

Bibliografía

- SCHNEIDER, T., SEMM, P. y VOLLRATH, L. (1981). Ultrastructural observations on the central innervation of the guinea-pig pineal gland. *Cell Tiss. Res.*, **220**: 41-19.
- SEWERYNEK, E., ABE, M., REITER, R.J., BARLOW-WALDEN, L.R., CHEN, L.D., MCCABE, T.J., ROMAN, L.J. y DIAZ-LOPEZ, B. (1995) Melatonin administration prevents lipopolysachharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *Journal of Cellular Biochemistry* (en prensa).
- SHAPIRA, H., LUPU-MEIRI, M., GERSHENGORN, M. C. y ORON, Y. (1990). Activation of two different receptors mobilizes calcium from distinct stores in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal* **57**, 1281-1285.
- SIMONNEAUX, V., EBADI, M. y BYLUND, D.B. (1991) Identification and characterization of alpha 2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol. Pharmacol.* **40** (2): 235-241.
- SIMONNEAUX, V., OUICHOU, A., PEVET, P., MASSON-PEVET, M., VIVIEN-ROELS, B. y VAUDRY, H. (1989). Kinetic study of melatonin release from rat pineal glands using a perfusion technique. *Journal of Pineal Research* **7**: 63-83.
- SMITH, T.L., EICHBERG, J. y HAUSER, G. (1979). Postsynaptic localization of the alpha receptor-mediated stimulation of phosphatidylinositol turnover in pineal gland. *Life Sciences* **24**, 2179-2185.

SOMERS, R.L. y KLEIN, D.C. (1984). Rhodopsin kinase activity in the mammalian pineal gland and other tissues. *Science*, **226**: 182-184.

STAUDERMAN, K.A., McKINNEY, R.A y MURAWSKY, M.M. (1991). The role of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in agonist- and 1,4,5,-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochemical Journal* **278**, 643-650.

STAUDERMAN, K.A. y PRUSS, R.M. (1989). Dissociation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} mobilization responses to angiotensin II in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Biological Chemistry* **264 (31)**: 18349-55.

STEHLE, J.H., FOULKES, N.S., MOLINA, C.A, SIMONNEAUX, V., PEVET, P. y SASSONE-CORSI, P. (1993). Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, **365**: 314.

SUGDEN, D., HO, A.K., SUGDEN, A.L. y KLEIN, D.C. (1988). Negative feedback mechanisms: evidence that desensitization of pineal α_1 -adrenergic responses involves protein kinase-C. *Endocrinology*, **123 (3)**: 1425.

SUGDEN, A.L., SUGDEN, D. y KLEIN, D.C. (1987). α_1 -adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 741-745.

Bibliografía

SUGDEN, D., VANECEK, J., KLEIN, D. C., THOMAS, T.P. y ANDERSON, W.B. (1985). Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* **314**, 359-361.

TAKAHASHI, T., NEHER, E. y SAKMANN, B. (1987). Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**, 5063-5067.

TAMARKIN, L., BAIRD, C.J. y ALMEIDA, O.F.X. (1985). Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction?. *Science*. **227** : 714-725.

TAN, D.X., CHEN, L.D., POEGGELER, B., MANCHESTER, L.C. y REITER, R.J.(1993a) Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* **1**:57-60.

TAN, D.X., REITER, R.J., CHEN, L.D., POEGGELER, B., MANCHESTER, L.C. y BARLOW-WALDEN, L.R. (1994) Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis* **15**: 215-218.

TAN, Y.P. y MARTY, A. (1991). Protein kinase C-mediated desensitization of the muscarinic response in rat lacrimal gland cells. *Journal of Physiology* **433**, 357-371.

TAYLOR, R.L., ALBUQUERQUE, M.L., y BURT, D.R. (1980). Muscarinic receptors in pineal. *Life Sciences* **26**, 2195-2200.

VANECEK, J., SUGDEN, D., WELLER, J. y KLEIN, D. C. (1985). Atypical synergistic alpha1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* **116**, 2167-2173.

VIJAYALAXMI, REITER, R.J. y MELTZ, M.L. (1995). Melatonin protects human blood lymphocytes from lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat. Res.*, (en prensa).

VOLLRATH, L. (1981). The pineal organ. En: *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen* **6** (7). A. Oksche y L. Vollrath (eds.), Springer, Berlín.

WITHYACHUMNARNKUL, B., NONAKA, K.O., SANTANA, C., ATTIA, A.M. y REITER, R.J. (1990). Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal gland in organ culture. *J. Interferon Res.* **10**: 403-411.

WURTMAN, R (1980). The pineal as a neuroendocrine transducer. En: *Neuroendocrinology*. pp: 102-108 D.T. Kreiger y J.C. Hughes (eds.) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

ZATZ, M. (1985). Denervation supersensitivity of the rat pineal to norepinephrine-stimulated [3H] inositide turnover revealed by lithium and a convenient procedure. *The Journal of Neurochemistry* **45**, 95-100.

Bibliografía

ZATZ, M. (1982). En: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 58/II. pp: 691-710.

J.W.Kebabian y J.A. Nathanson, J.A. (eds). Springer, Berlín.

ZATZ, M., MULLEN, D.A. y MOSKAL, J.P. (1988). Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm. *Brain Research* 438: 199-215.

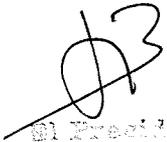
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. _____ titulada _____

acordó otorgarle la calificación de _____

Sevilla, _____ de _____ 19____

El Vocál,



El Presidente

El Vocal,



El Secretario,

El Vocal,



El Doctorado,

